

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 3 月 21 日 (21.03.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/22170 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 45/00, 38/17, A61P 3/10, 25/00, 13/12, 27/02, 3/06, 15/10, 17/00, 19/02, 19/10
- (74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒541-0044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目2番14号 藤村大和生命ビル Osaka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/07816
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) 国際出願日: 2001 年 9 月 10 日 (10.09.2001)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2000-280153 2000 年 9 月 11 日 (11.09.2000) JP
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 六反一仁 (ROKUTAN, Kazuhito) [JP/JP]; 〒532-0002 大阪府大阪市淀川区東三国2丁目11番30-303 Osaka (JP).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: INSULIN SECRETION CONTROLLING AGENTS

(54) 発明の名称: インスリン分泌調節剤

(57) Abstract: Novel insulin secretion controlling agents are provided. It is found out that IgE-dependent histamine releasing factors (IgE-dependent HRFs) such as tumor-associated protein (TCTP) are controlling factors for insulin secreted from pancreatic β cells. Substances inhibiting the effect of the IgE-dependent HRFs are useful as insulin secretion promoters and preventives and remedies for diabetes, while the IgE-dependent HRFs or substances having the effect are useful as insulin secretion inhibitors.

(57) 要約:

本発明は、新規なインスリン分泌調節剤を提供する。本発明は、腫瘍関連蛋白質 (TCTP) のような IgE 依存性ヒスタミン放出因子 (IgE 依存性 HRF) が、膵 β 細胞から分泌されるインスリン分泌調節因子であることを見出したことに基づく。IgE 依存性 HRF の作用を阻害する物質はインスリン分泌促進剤、糖尿病予防・治療剤として、IgE 依存性 HRF またはその作用を有する物質はインスリン分泌阻害剤として有用である。

WO 02/22170 A1

明細書

インスリン分泌調節剤

技術分野

本発明は、I g E依存性ヒスタミン放出因子の作用を阻害する物質を含有してなるインスリン分泌促進剤、I g E依存性ヒスタミン放出因子またはその作用を有する物質を含有してなるインスリン分泌阻害剤、インスリン分泌調節物質のスクリーニング方法などに関する。

背景技術

翻訳段階で発現調節される分子量 21 kDa の腫瘍関連蛋白質 (translationally controlled tumor protein p21; 以下、TCTP p21) は、マウスの赤白血病細胞から腫瘍関連蛋白質の一つとして、1983 年 Brawerman らによって初めて同定された (モレキュラー・セル・バイオロジー (Mol. Cell. Biol.), 第3巻、1197-1203)。その後、Ehrlich 癌細胞よりヒトのホモログ (TCTP p23) が同定され (ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Res.), 第16巻、2350)、マウスおよびヒト TCTP の cDNA は、1988 年と 1989 年にそれぞれクローニングされた (ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Res.), 第17巻、8367; ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Res.), 第16巻、2350)。

TCTP は酵母 (イースト (Yeast)、1994 年、第10巻、Suppl A、S63-68)、植物 (プラント・モレキュラー・バイオロジー (Plant. Mol. Biol.))、1992 年、第19巻、501-503) からヒトまで進化を越えて保存されている遺伝子産物であることも明らかにされた (エレクトロフォoresis (Electrophoresis)、1991 年、第18巻、150-155)。TCTP は細胞増殖に伴い誘導されることから、増殖との関連が示唆されているが (ジャーナル・リユーコサイト・バイオロジー (J. Leuk. Biol)、1995 年、第57巻、507-512; バイオケミストリー・インターナショナル (Biochem. Int.))、1989 年、第19巻、277-286)、その機能についてはほとんど明らかにされていない。TCTP の合成は、mRNA の 5'-非翻訳領域 (untranslated

region ; UTR) における polypirimidine tract を介して転写後レベルでコントロールされており、in vitro ではmRNAの3'-UTRが翻訳段階でのTC TP蛋白質合成の調節に関わっていることが示唆されている (バイオメディカル・バイオケミカル・アクタ (Biomed. Biochem. Acta)、1991 年、第50巻、1193-1203 ; セル・モレキュラー・バイオリジカル・リサーチ (Cell. Mol. Biol. Res.))、1994 年、第40巻、633-641)。

TC TPは、腫瘍細胞以外にもケラチノサイト、肝細胞、リンパ球、血小板およびマクロファージなどの正常細胞で発現している (エレクトロフォレシス (Electrophoresis)、1997 年、第18巻、150-155 ; エレクトロフォレシス (Electrophoresis)、1992 年、第13巻、992-1001 ; エレクトロフォレシス (Electrophoresis)、1992 年、第13巻、893-959)。1995 年に MacDonald らは、ヒト単球細胞株U937の培養上清からIgE存在下で好塩基球からのヒスタミン放出を促す因子 (histamine releasing factor ; HRF) を同定した (サイエンス (Science)、1995 年、第269巻、688-690)。この因子はヒトTC TP p23と同一蛋白質であることが判明し、このためTC TPは遅発性アレルギー炎症反応の誘導因子である可能性が報告されている。しかしながら、TC TPとインスリン分泌との関連性については全く報告されていない。

現在、日本人の糖尿病罹患者は境界型糖尿病を含めると約一千万人に達しようとしている。糖尿病に付随した心臓血管病、腎不全、網膜症、神経症の治療費は膨大であり、医療費の増加による国民の負担は毎年増大している。

糖尿病の治療薬として、インスリン製剤、インスリン分泌刺激剤、インスリン抵抗性改善剤、グルコース吸収阻害剤などが使用され、血糖値のコントロールには一定の効果を上げている。しかしながら、糖尿病の合併症を含めてより有効な薬剤の開発が必要とされている。

発明の開示

本発明は、インスリン分泌調節剤およびインスリン分泌調節物質のスクリーニング方法等を提供することを目的とする。

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、TC TPの新たな機能として以下の点

を発見した。

- 1) 膵臓の β 細胞はTCTPを高発現していること。
- 2) 摂食を開始すると、0.5～1時間以降に膵臓でのTCTPの発現量が増加し、末梢血中にTCTPが分泌されること。
- 3) マウス膵 β 細胞株であるMIN6細胞に高グルコース負荷やインスリン刺激を行なうとMIN6細胞からのTCTPの分泌が誘導されること。
- 4) MIN6細胞およびマウスの単離膵ランゲルハンス島にリコンビナントTCTPを作用させると、グルコース刺激によるインスリン分泌が阻害されること。
- 5) TCTPの中和抗体を作用させると、グルコース刺激によるマウス単離膵ランゲルハンス島からのインスリン分泌抑制が解除され、さらに、中和抗体存在下では、内因性に分泌されるTCTPの作用をブロックしてインスリン分泌能が改善されること。

本発明者らは、これらの知見に基づいて、TCTPが膵 β 細胞から分泌される新たなインスリン分泌調節因子であることを見出し、さらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

〔1〕 I g E依存性ヒスタミン放出因子の作用を阻害する物質を含有してなるインスリン分泌促進剤、

〔2〕 I g E依存性ヒスタミン放出因子の作用を阻害する物質を含有してなる糖尿病の予防・治療剤、

〔3〕 I g E依存性ヒスタミン放出因子の作用を阻害する物質が① I g E依存性ヒスタミン放出因子の受容体アンタゴニスト、② I g E依存性ヒスタミン放出因子に対する抗体、③ I g E依存性ヒスタミン放出因子の発現抑制物質、④ I g E依存性ヒスタミン放出因子を分解する物質または⑤ I g E依存性ヒスタミン放出因子の分解を促進する物質である第〔1〕項または第〔2〕項記載の剤、

〔4〕 I g E依存性ヒスタミン放出因子が腫瘍関連蛋白質である第〔1〕項～第〔3〕項のいずれかに項記載の剤、

〔5〕 I g E依存性ヒスタミン放出因子が腫瘍関連蛋白質 p 2 1、腫瘍関連蛋白質 p 2 3または腫瘍関連蛋白質 p 2 6である第〔1〕項～第〔3〕項のいずれか

に記載の剤、

〔6〕インスリン分泌不全に起因する疾患の予防・治療剤である第〔1〕項記載の剤、

〔7〕耐糖能障害、ケトーシス、アシドーシス、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、高脂血症、性機能障害、皮膚疾患、関節症または骨減少症の予防・治療剤である第〔1〕項記載の剤、

〔8〕哺乳動物に対して、I g E依存性ヒスタミン放出因子の作用を阻害する物質の有効量を投与することを特徴とするインスリン分泌促進方法、

〔9〕哺乳動物に対して、I g E依存性ヒスタミン放出因子の作用を阻害する物質の有効量を投与することを特徴とするインスリン分泌不全に起因する疾患の予防・治療方法、

〔10〕哺乳動物に対して、I g E依存性ヒスタミン放出因子の作用を阻害する物質の有効量を投与することを特徴とする耐糖能障害、ケトーシス、アシドーシス、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、高脂血症、性機能障害、皮膚疾患、関節症または骨減少症の予防・治療方法、

〔11〕哺乳動物に対して、I g E依存性ヒスタミン放出因子の作用を阻害する物質の有効量を投与することを特徴とする糖尿病の予防・治療方法、

〔12〕インスリン分泌促進剤を製造するためのI g E依存性ヒスタミン放出因子の作用を阻害する物質の使用、

〔13〕インスリン分泌不全に起因する疾患の予防・治療剤を製造するためのI g E依存性ヒスタミン放出因子の作用を阻害する物質の使用、

〔14〕耐糖能障害、ケトーシス、アシドーシス、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、高脂血症、性機能障害、皮膚疾患、関節症または骨減少症の予防・治療剤を製造するためのI g E依存性ヒスタミン放出因子の作用を阻害する物質の使用、

〔15〕糖尿病の予防・治療剤を製造するためのI g E依存性ヒスタミン放出因子の作用を阻害する物質の使用、

〔16〕I g E依存性ヒスタミン放出因子またはその作用を有する物質を含有してなるインスリン分泌阻害剤、

〔17〕 I g E依存性ヒスタミン放出因子の作用を有する物質が① I g E依存性ヒスタミン放出因子の受容体アゴニスト、② I g E依存性ヒスタミン放出因子の作用を増強もしくは促進する物質、③ I g E依存性ヒスタミン放出因子の発現促進物質または④ I g E依存性ヒスタミン放出因子の分解を阻害する物質である第〔16〕項記載の剤、

〔18〕 I g E依存性ヒスタミン放出因子が腫瘍関連蛋白質である第〔16〕項または第〔17〕項記載の剤、

〔19〕 I g E依存性ヒスタミン放出因子が腫瘍関連蛋白質 p 2 1、腫瘍関連蛋白質 p 2 3または腫瘍関連蛋白質 p 2 6である第〔16〕項または第〔17〕項記載の剤、

〔20〕 インスリン過剰分泌に起因する疾患の予防・治療剤である第〔16〕項記載の剤、

〔21〕 肥満、高脂血症、2型糖尿病、低血糖症、高血圧、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、浮腫、インスリン抵抗性、不安定糖尿病、脂肪萎縮、インスリンアレルギーまたはインスリノーマの予防・治療剤である第〔16〕項記載の剤、

〔22〕 哺乳動物に対して、I g E依存性ヒスタミン放出因子またはその作用を有する物質の有効量を投与することを特徴とするインスリン過剰分泌に起因する疾患の予防・治療方法、

〔23〕 哺乳動物に対して、I g E依存性ヒスタミン放出因子またはその作用を有する物質の有効量を投与することを特徴とする肥満、高脂血症、2型糖尿病、低血糖症、高血圧、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、浮腫、インスリン抵抗性、不安定糖尿病、脂肪萎縮、インスリンアレルギーまたはインスリノーマの予防・治療方法、

〔24〕 インスリン過剰分泌に起因する疾患の予防・治療剤を製造するための I g E依存性ヒスタミン放出因子またはその作用を有する物質の使用、

〔25〕 肥満、高脂血症、2型糖尿病、低血糖症、高血圧、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、浮腫、インスリン抵抗性、不安定糖尿病、脂肪萎縮、インスリンアレルギーまたはインスリノーマの予防・治療剤を製造するための I

g E依存性ヒスタミン放出因子またはその作用を有する物質の使用、

〔26〕 I g E依存性ヒスタミン放出因子および（または） I g E依存性ヒスタミン放出因子受容体を用いることを特徴とするインスリン分泌調節物質のスクリーニング方法、

〔27〕 I g E依存性ヒスタミン放出因子をコードするDNAおよび（または） I g E依存性ヒスタミン放出因子受容体をコードするDNAを用いることを特徴とするインスリン分泌調節物質のスクリーニング方法、

〔28〕 I g E依存性ヒスタミン放出因子および（または） I g E依存性ヒスタミン放出因子受容体を含有することを特徴とするインスリン分泌調節物質のスクリーニング用キット、

〔29〕 I g E依存性ヒスタミン放出因子をコードするDNAおよび（または） I g E依存性ヒスタミン放出因子受容体をコードするDNAを含有することを特徴とするインスリン分泌調節物質のスクリーニング用キット、

〔30〕 第〔26〕項または第〔27〕項記載のスクリーニング方法または第〔28〕項または第〔29〕項記載のスクリーニング用キットを用いて得られうるインスリン分泌調節物質、

〔31〕 第〔26〕項または第〔27〕項記載のスクリーニング方法または第〔28〕項または第〔29〕項記載のスクリーニング用キットを用いて得られうるインスリン分泌調節物質を含有してなる医薬、

〔32〕 インスリン分泌調節剤である第〔31〕項記載の医薬、

〔33〕 糖尿病の予防・治療剤である第〔31〕項記載の医薬、

〔34〕 哺乳動物に対して、第〔26〕項または第〔27〕項記載のスクリーニング方法または第〔28〕項または第〔29〕項記載のスクリーニング用キットを用いて得られうるインスリン分泌調節物質の有効量を投与することを特徴とするインスリン分泌調節方法、

〔35〕 哺乳動物に対して、第〔26〕項または第〔27〕項記載のスクリーニング方法または第〔28〕項または第〔29〕項記載のスクリーニング用キットを用いて得られうるインスリン分泌調節物質の有効量を投与することを特徴とする糖尿病の予防・治療方法、

〔３６〕 I g E依存性ヒスタミン放出因子に対する抗体を含有することを特徴とするインスリン分泌異常の診断剤、

〔３７〕 I g E依存性ヒスタミン放出因子に対する抗体を用いることを特徴とするインスリン分泌異常の診断方法、

〔３８〕 I g E依存性ヒスタミン放出因子をコードするDNAを含有することを特徴とするインスリン分泌異常の診断剤、および

〔３９〕 I g E依存性ヒスタミン放出因子をコードするDNAを用いることを特徴とするインスリン分泌異常の診断方法に関する。

さらには、本発明は、

〔４０〕 I g E依存性ヒスタミン放出因子の分子量が約 21 kDa ~ 26 kDa である第〔１〕項、第〔２〕項または第〔１６〕項記載の剤、

〔４１〕 I g E依存性ヒスタミン放出因子が、①腫瘍関連蛋白質 p 21、腫瘍関連蛋白質 p 23 または腫瘍関連蛋白質 p 26 のアミノ酸配列、②腫瘍関連蛋白質 p 21、腫瘍関連蛋白質 p 23 または腫瘍関連蛋白質 p 26 のアミノ酸配列中の 1 または 2 個以上（好ましくは、1 ~ 30 個程度、より好ましくは 1 ~ 9 個程度、さらに好ましくは数個（1 ~ 5 個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、③腫瘍関連蛋白質 p 21、腫瘍関連蛋白質 p 23 または腫瘍関連蛋白質 p 26 のアミノ酸配列に 1 または 2 個以上（好ましくは、1 ~ 30 個程度、より好ましくは 1 ~ 10 個程度、さらに好ましくは数個（1 ~ 5 個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、④腫瘍関連蛋白質 p 21、腫瘍関連蛋白質 p 23 または腫瘍関連蛋白質 p 26 のアミノ酸配列中の 1 または 2 個以上（好ましくは、1 ~ 30 個程度、より好ましくは 1 ~ 10 個程度、さらに好ましくは数個（1 ~ 5 個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または⑤それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質である第〔１〕項、第〔２〕項または第〔１６〕項記載の剤、

〔４２〕 (i) I g E依存性ヒスタミン放出因子とその受容体とを接触させた場合と、(ii) I g E依存性ヒスタミン放出因子とその受容体および試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする第〔２６〕項記載のスクリーニング方法、

〔４３〕（ｉ）標識した I g E 依存性ヒスタミン放出因子を I g E 依存性ヒスタミン放出因子受容体に接触させた場合と、（ii）標識した I g E 依存性ヒスタミン放出因子および試験化合物を I g E 依存性ヒスタミン放出因子受容体に接触させた場合における、標識した I g E 依存性ヒスタミン放出因子の I g E 依存性ヒスタミン放出因子受容体に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする I g E 依存性ヒスタミン放出因子と I g E 依存性ヒスタミン放出因子受容体との結合性を変化させる化合物またはその塩（インスリン分泌調節物質）のスクリーニング方法、

〔４４〕（ｉ）標識した I g E 依存性ヒスタミン放出因子を I g E 依存性ヒスタミン放出因子受容体を含有する細胞に接触させた場合と、（ii）標識した I g E 依存性ヒスタミン放出因子および試験化合物を I g E 依存性ヒスタミン放出因子受容体を含有する細胞に接触させた場合における、標識した I g E 依存性ヒスタミン放出因子の該細胞に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする I g E 依存性ヒスタミン放出因子と I g E 依存性ヒスタミン放出因子受容体との結合性を変化させる化合物またはその塩（インスリン分泌調節物質）のスクリーニング方法、

〔４５〕（ｉ）標識した I g E 依存性ヒスタミン放出因子を I g E 依存性ヒスタミン放出因子受容体を含有する細胞の膜面分に接触させた場合と、（ii）標識した I g E 依存性ヒスタミン放出因子および試験化合物を I g E 依存性ヒスタミン放出因子受容体を含有する細胞の膜面分に接触させた場合における、標識した I g E 依存性ヒスタミン放出因子の該細胞に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする I g E 依存性ヒスタミン放出因子と I g E 依存性ヒスタミン放出因子受容体との結合性を変化させる化合物またはその塩（インスリン分泌調節物質）のスクリーニング方法、

〔４６〕（ｉ） I g E 依存性ヒスタミン放出因子受容体を活性化する化合物を I g E 依存性ヒスタミン放出因子受容体を含有する細胞に接触させた場合と、（ii） I g E 依存性ヒスタミン放出因子受容体を活性化する化合物および試験化合物を I g E 依存性ヒスタミン放出因子受容体を含有する細胞に接触させた場合における、 I g E 依存性ヒスタミン放出因子受容体を介した細胞刺激活性を測定

し、比較することを特徴とする I g E 依存性ヒスタミン放出因子と I g E 依存性ヒスタミン放出因子受容体との結合性を変化させる化合物またはその塩（インスリン分泌調節物質）のスクリーニング方法、

〔47〕 I g E 依存性ヒスタミン放出因子受容体を活性化する化合物が、腫瘍関連蛋白質 p 2 1、腫瘍関連蛋白質 p 2 3 または腫瘍関連蛋白質 p 2 6 である第〔46〕項記載のスクリーニング方法、

〔48〕 第〔42〕項～第〔47〕項記載のスクリーニング方法で得られうる I g E 依存性ヒスタミン放出因子と I g E 依存性ヒスタミン放出因子受容体との結合性を変化させる化合物またはその塩（インスリン分泌調節物質）、

〔49〕 第〔42〕項～第〔47〕項記載のスクリーニング方法で得られうる I g E 依存性ヒスタミン放出因子と I g E 依存性ヒスタミン放出因子受容体との結合性を変化させる化合物またはその塩（インスリン分泌調節物質）を含有することを特徴とする医薬、

〔50〕 (i) I g E 依存性ヒスタミン放出因子受容体を活性化する化合物をインスリン分泌細胞に接触させた場合と、(ii) I g E 依存性ヒスタミン放出因子受容体を活性化する化合物および試験化合物をインスリン分泌細胞に接触させた場合における、インスリンの分泌量を測定し、比較することを特徴とするインスリン分泌調節物質のスクリーニング方法、

〔51〕 (i) 非ヒト哺乳動物の①血液、②特定の臓器（例、膵臓）、③臓器から単離した組織（例、ランゲルハンス島）もしくは細胞（例、膵臓β細胞、MIN 6 細胞）または (ii) 形質転換体に含まれる T C T P または T C T P 受容体の m R N A 量を測定することによる、T C T P または T C T P 受容体の発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法、

〔52〕 第〔50〕項または第〔51〕項記載のスクリーニング方法で得られうるインスリン分泌調節物質（T C T P または T C T P 受容体の発現量を変化させる化合物を含む）、

〔53〕 第〔50〕項または第〔51〕項記載のスクリーニング方法で得られうるインスリン分泌調節物質を含有してなるインスリン分泌調節剤（T C T P または T C T P 受容体の発現量を変化させる化合物を含む）、

〔54〕 I g E 依存性ヒスタミン放出因子に対する抗体と、被検液および標識化された I g E 依存性ヒスタミン放出因子とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された I g E 依存性ヒスタミン放出因子の割合を測定することを特徴とする被検液中の I g E 依存性ヒスタミン放出因子の定量法、

〔55〕 被検液と担体上に不溶化した I g E 依存性ヒスタミン放出因子に対する抗体および標識化された I g E 依存性ヒスタミン放出因子に対する抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定すること、を特徴とする被検液中の I g E 依存性ヒスタミン放出因子の定量法、および

〔56〕 インスリン分泌異常の診断方法である第〔54〕項または第〔55〕項記載の診断方法等を提供する。

図面の簡単な説明

図1は、マウス（A）、ラット（B）およびモルモット（C）の各組織での T C T P p 2 1 蛋白質の発現を抗 T C T P p 2 1 抗体を用いたウェスタンブロット法で調べた結果を示す。

図2は、マウス膵臓組織での T C T P p 2 1 およびインスリンの発現を蛍光抗体二重免疫組織染色により確認した結果を示す。

図3は、グルコース刺激した場合の膵β細胞内および培養上清中の T C T P p 2 1 蛋白質量変化を経時的に調べた結果を示す。

図4は、高グルコース下（25 mMグルコース）および低グルコース下（2.8 mMグルコース）で10 nMのインスリンをMIN6細胞に添加し、細胞内の T C T P p 2 1 蛋白質量の変化をウェスタンブロット法により経時的に調べた結果を示す。Aは高グルコース下（25 mMグルコース）、Bは低グルコース下（2.8 mMグルコース）、Cは低グルコース下（2.8 mMグルコース）の培養上清中の T C T P p 2 1 蛋白質量を示す。

図5は、一晩絶食したマウスに食餌を与え膵臓における T C T P p 2 1 蛋白質量をウェスタンブロット法で経時的に調べた結果を示す。

図6は、食餌摂取したマウスの血漿（A）、膵臓（B）および肝臓（C）での T C T P p 2 1 蛋白質量をウェスタンブロット法で経時的に調べた結果を示す。

図7は、MIN6細胞を各濃度のグルコースで4時間培養した際の細胞内の

TCTP p 2 1 蛋白質の発現レベルを調べた結果を示す。

図 8 は、一晩絶食させたマウスにグルコースを経口投与した時の膵組織（左図）と血清（右図）における TCTP p 2 1 量の変化を調べた結果を示す。

図 9 は、一晩絶食させたマウスに固形食を与えた時の膵組織（左図）と血清（右図）における TCTP p 2 1 量の変化を調べた結果を示す。

図 10 は、一晩絶食させたマウスにグルコースを腹腔内投与した時のインスリン分泌量に対する中和抗体の効果を調べた結果を示す。○は正常ウサギ IgG を、■は中和抗体を投与した時の結果を示す。

図 11 は、一晩絶食させたマウスにグルコースを腹腔内投与した時のインスリン分泌および血糖値に対するリコンビナント TCTP p 2 1 の効果を調べた結果を示す。ビークルは生理食塩水を投与した時の効果を、r TCTP はリコンビナント TCTP p 2 1 を投与した時の結果を示す。

図 12 は、MIN 6 細胞にリコンビナント TCTP p 2 1 を添加した時のプロインスリン mRNA 量を調べた結果を示す。ビークルは生理食塩水を添加した時の効果を、r TCTP はリコンビナント TCTP p 2 1 を添加した時の結果を示す。（h）はグルコース刺激後の時間を示す。

図 13 は、リコンビナント TCTP p 2 1 を MIN 6 細胞に添加した際の細胞内インスリン含量の変化を調べた結果を示す。ビークルは生理食塩水を添加した時の効果を、r TCTP はリコンビナント TCTP p 2 1 を添加した時の結果を示す。横軸はグルコース濃度を、縦軸はインスリン濃度を示す。

図 14 は、TCTP p 2 1 過剰発現によるインスリン分泌阻害作用を調べた結果を示す。ベクターはベクターのみを導入した細胞の結果を、TCTP は TCTP p 2 1 を過剰発現させた細胞の結果を示す。横軸はグルコース濃度を、縦軸はインスリン分泌量を示す。

図 15 は、空腹時のマウスの血清中の TCTP p 2 1 レベルを測定した結果を示す。Normal chow は水道水を 4 週間飲水させたマウスの、2 wks high glucose は 10%グルコース水を 2 週間飲水させたマウスの、4 wks high glucose は 10%グルコース水を 4 週間飲水させたマウスの結果を示す。

図 16 は、10%グルコース水を 4 週間飲水させたマウスに TCTP p 2 1 中

和抗体を投与してインスリンレベルの経時的変化を調べた結果を示す。横軸は中和抗体投与後の時間を、縦軸は血中インスリン値の割合を示す。□は正常ウサギ IgG を、■は中和抗体を投与した時の結果を示す。

図 17 は、10%グルコース水を 4 週間飲水させたマウスに TCTP p 21 中和抗体を投与して血糖レベルの経時的変化を調べた結果を示す。横軸は中和抗体投与後の時間を、縦軸は血糖値の割合を示す。□は正常ウサギ IgG を、■は中和抗体を投与した時の結果を示す。

発明の詳細な説明

I g E 依存性ヒスタミン放出因子 (I g E 依存性 H R F) としては、例えば、哺乳動物 (例えば、ヒト、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど) の腫瘍細胞、ケラチノサイト、肝機能、リンパ球、血小板、マクロファージなどに由来する I g E 依存性 H R F、酵母や植物から単離される I g E 依存性 H R F、合成 I g E 依存性 H R F、I g E 依存性 H R F 遺伝子から製造される組換え型 I g E 依存性 H R F などが用いられる。I g E 依存性 H R F の分子量は、特に限定されないが、例えば約 21 k D a ~ 約 30 k D a、好ましくは約 21 k D a ~ 約 26 k D a、特に好ましくは約 26 k D a である。

具体的に、I g E 依存性 H R F としては、腫瘍関連蛋白質 (以下、TCTP) p 21 (モレキュラー・セル・バイオロジー (Mol. Cell. Biol.), 第 3 巻、1197-1203)、TCTP p 23 (ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Res.), 第 16 巻、2350)、TCTP p 26 (モレキュラー・セル・バイオロジー (Mol. Cell. Biol.), 第 3 巻、1197-1203) などの腫瘍関連蛋白質が挙げられる。

これら TCTP p 21 (マウス型)、TCTP p 23 (ヒト型)、TCTP p 26 (マウス型) は公知物質であり、自体公知の方法を用いて製造することができ、また市販のものを使用することもできる。例えば、マウスおよびヒト TCTP は、遺伝子工学技術を用いて、例えばヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Res.), 第 17 巻、8367 およびヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Res.), 第 16 巻、2350 にそれぞれ記載された cDNA を用いて製造することができる。さらに、本発明においては、将来新たに

見出されるであろう I g E 依存性 H R F も使用することができる。

また、I g E 依存性 H R F は、T C T P p 2 1、T C T P p 2 3 または T C T P p 2 6 のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質であつてもよい。T C T P p 2 1 のアミノ酸配列は配列番号：1 で、T C T P p 2 3 のアミノ酸配列は配列番号：2 で、T C T P p 2 6 のアミノ酸配列は配列番号：3 で表わされる。

T C T P p 2 1、T C T P p 2 3 または T C T P p 2 6 のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、T C T P p 2 1、T C T P p 2 3 または T C T P p 2 6 のアミノ酸配列と約 5 0 % 以上、好ましくは約 6 0 % 以上、より好ましくは約 7 0 % 以上、さらに好ましくは約 8 0 % 以上、なかでも好ましくは約 9 0 % 以上、最も好ましくは約 9 5 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

T C T P p 2 1、T C T P p 2 3 または T C T P p 2 6 のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質としては、例えば、T C T P p 2 1、T C T P p 2 3 または T C T P p 2 6 のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、T C T P p 2 1、T C T P p 2 3 または T C T P p 2 6 と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが好ましい。

T C T P p 2 1、T C T P p 2 3 または T C T P p 2 6 と実質的に同質の活性としては、例えば、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用、インスリン分泌阻害作用などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用、インスリン分泌阻害などの活性が同等（例、約 0. 0 1 ~ 1 0 0 倍、好ましくは約 0. 5 ~ 2 0 倍、より好ましくは約 0. 5 ~ 2 倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度や蛋白質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用、インスリン分泌阻害作用などの活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後に記載するスクリーニング方法に従って測定することができる。

また、I g E 依存性 H R F は、① T C T P p 2 1、T C T P p 2 3 または T C T P p 2 6 のアミノ酸配列中の 1 または 2 個以上（好ましくは、1 ~ 3 0 個

程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②TCTP p 21、TCTP p 23またはTCTP p 26のアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③TCTP p 21、TCTP p 23またはTCTP p 26のアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質であってもよい。

IgE依存性HRFは、ペプチド標記の慣例に従って、左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。TCTP p 21、TCTP p 23またはTCTP p 26をはじめとするIgE依存性HRFは、C末端がカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステルの何れであってもよい。

また、IgE依存性HRFには、IgE依存性HRF遺伝子の全ての産物が含まれ、同遺伝子のスプライシングバリエーションやリン酸化、アシル化、糖鎖の付加、プロテアーゼのプロセッシングなどの修飾をうけた全ての蛋白質もしくはその部分ペプチドも含まれる。

IgE依存性HRFの部分ペプチドとしては、前記したIgE依存性HRFのペプチド断片で、IgE依存性HRFと実質的に同質の活性を有するものが含まれる。該部分ペプチドの分子量、構成アミノ酸の数などは特に限定されない。

該部分ペプチドは、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいはIgE依存性HRFを適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、IgE依存性HRFを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

①M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide

Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966 年)

②Schroeder および Luebke、ザ ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965 年)

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975 年)

④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、蛋白質の化学 IV、205、(1977 年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発 第 14 巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

TCTP p 21、TCTP p 23 または TCTP p 26 をはじめとする IgE 依存性HRF をコードするポリヌクレオチドとしては、上記した IgE 依存性HRF をコードする塩基配列 (DNA または RNA、好ましくは DNA) を含有するものであればいかなるものであってもよい。該ポリヌクレオチドとしては、IgE 依存性HRF をコードする DNA、mRNA 等の RNA であり、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖 DNA、二本鎖 RNA または DNA:RNA のハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖 (すなわち、コード鎖) であっても、アンチセンス鎖 (すなわち、非コード鎖) であってもよい。

IgE 依存性HRF をコードするポリヌクレオチドを用いて、例えば、公知の実験医学増刊「新PCRとその応用」15 (7)、1997 記載の方法またはそれに準じた方法により、IgE 依存性HRF の mRNA を定量することができる。

IgE 依存性HRF をコードする DNA としては、前述した IgE 依存性HRF をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来の cDNA、前記した細胞・組織由来の cDNA ライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織より total RNA または mRNA 画分を調製したものをを用いて直接 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR 法と略称する) によって増幅することもできる。

具体的には、TCTP p 21 をコードする DNA としては、例えば配列番号：4 で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、TCTP p 21 と実質的に同質の活性を有するペプチドをコードする DNA などであれば何れのものでもよい。

配列番号：4 で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできる塩基配列としては、例えば、配列番号：4 で表わされる塩基配列と約 70% 以上、好ましくは約 80% 以上、より好ましくは約 90% 以上、さらに好ましくは約 95% 以上の相同性を有する塩基配列などが用いられる。

TCTP p 23 をコードする DNA としては、例えば配列番号：5 で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、TCTP p 23 と実質的に同質の活性を有するペプチドをコードする DNA などであれば何れのものでもよい。

配列番号：5 で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできる塩基配列としては、例えば、配列番号：5 で表わされる塩基配列と約 70% 以上、好ましくは約 80% 以上、より好ましくは約 90% 以上、さらに好ましくは約 95% 以上の相同性を有する塩基配列などが用いられる。

TCTP p 26 をコードする DNA としては、例えば配列番号：6 で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、TCTP p 26 と実質的に同質の活性を有するペプチドをコードする DNA などであれば何れのものでもよい。

配列番号：6 で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできる塩基配列としては、例えば、配列番号：6 で表わされる塩基配列と約 70% 以上、好ましくは約 80% 以上、より好ましくは約 90% 以上、さらに好ましくは約 95% 以上の相同性を有する塩基配列などが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約 19 ~ 40 mM、好ましくは約 19 ~ 20 mM で、温度が約 50 ~ 70 °C、好ましくは約 60 ~ 65 °C の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約 19 mM で温度が約 65 °C の場合が最も好ましい。

より具体的には、

(i) 配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列を含有する TCTP p21 をコードする DNA としては、配列番号：4 で表わされる塩基配列を含有する DNA などが用いられ、

(ii) 配列番号：2 で表わされるアミノ酸配列を含有する TCTP p23 をコードする DNA としては、配列番号：5 で表わされる塩基配列を含有する DNA などが用いられ、

(iii) 配列番号：3 で表わされるアミノ酸配列を含有する TCTP p26 をコードする DNA としては、配列番号：6 で表わされる塩基配列を含有する DNA などが用いられる。

IgE 依存性 HRF の部分ペプチドをコードする DNA としては、前述した IgE 依存性 HRF の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノム DNA、ゲノム DNA ライブラリー、前記した細胞・組織由来の cDNA、前記した細胞・組織由来の cDNA ライブラリー、合成 DNA のいずれでもよい。

具体的には、TCTP p21 の部分ペプチドをコードする DNA としては、例えば、配列番号：4 で表わされる塩基配列を含有する DNA の部分塩基配列を有する DNA、または配列番号：4 で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、TCTP p21 と実質的

に同質の活性を有するペプチドをコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

TCTP p 23の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：5で表わされる塩基配列を含有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または配列番号：5で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、TCTP p 23と実質的に同質の活性を有するペプチドをコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

TCTP p 26の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：6で表わされる塩基配列を含有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または配列番号：6で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、TCTP p 26と実質的に同質の活性を有するペプチドをコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

配列番号：4、配列番号：5または配列番号：6で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAは、前記と同意義を示す。

ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と同様のものが用いられる。

IgE依存性HRFの作用を阻害する物質は、IgE依存性HRFのインスリン分泌阻害作用を直接的にまたは間接的に阻害し得る物質であれば、特に限定されない。具体的には、IgE依存性HRFの作用を阻害する物質としては、IgE依存性HRFの受容体アンタゴニスト、IgE依存性HRFに対する抗体、IgE依存性HRFの発現抑制物質、IgE依存性HRFを分解する物質、IgE依存性HRFの分解を促進する物質などのIgE依存性HRFの作用または発現を阻害（抑制）する物質が用いられる。

IgE依存性HRFの受容体アンタゴニストとは、IgE依存性HRFの受容体に結合して、IgE依存性HRFとIgE依存性HRF受容体との結合を阻害するが、IgE依存性HRFの作用を有しない物質をいい、公知物質あるいは将来見出される新規物質の何れであってもよい。

I g E依存性H R Fに対する抗体としては、I g E依存性H R Fに対するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体の何れであってもよく、I g E依存性H R Fを抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。具体的には、以下の方法に従って製造することができる。

〔モノクローナル抗体の作製〕

(a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

I g E依存性H R Fは、哺乳動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行なわれる。用いられる哺乳動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えば、マウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、標識化I g E依存性H R Fと抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256巻、495頁 (1975年)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (P E G) やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはP E Gが用いられる。

骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0などが挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞 (脾臓細胞) 数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:1～20:1程度であり、P E G (好ましくは、P E G1000～P E G6000) が10～80%程度の濃度で添加され、約20～40℃、好ましくは約30～37℃で約1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、I g E依存性H R F抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したI g E依存性H R Fを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができるが、通常はH A T（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地などで行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むR P M I 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むG I T培地（和光純薬工業（株））またはハイブリドーマ培養用無血清培地（S F M-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

（b）モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、D E A E）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相またはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

〔ポリクローナル抗体の作製〕

I g E依存性H R Fに対するポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそ

れに準じる方法にしたがって製造することができる。例えば、免疫 I g E 依存性 H R F 抗原とキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に哺乳動物に免疫を行ない、該免疫動物から I g E 依存性 H R F に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造できる。

哺乳動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミン、ウシサイログロブリン、キーホール・リンペット・ヘモシアニン等を重量比でハプテン 1 に対し、約 0.1 ~ 20、好ましくは約 1 ~ 5 の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約 2 ~ 6 週毎に 1 回ずつ、計約 3 ~ 10 回程度行なうことができる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

I g E 依存性 H R F の発現抑制物質とは、前記した I g E 依存性 H R F の発現を抑制する物質であれば特に限定されないが、例えば、I g E 依存性 H R F 遺伝子の発現阻害物質、I g E 依存性 H R F 遺伝子のプロモーター阻害物質、I g E 依存性 H R F m R N A の発現阻害物質、I g E 依存性 H R F m R N A の翻訳阻害物質、I g E 依存性 H R F の分泌阻害物質などが用いられ、具体的には、前記

した I g E 依存性 H R F をコードする D N A に対するアンチセンス D N A が好ましく用いられる。

I g E 依存性 H R F をコードする D N A に相補的または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有するアンチセンス D N A としては、I g E 依存性 H R F をコードする D N A に相補的または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有し、該 D N A の発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンス D N A であってもよい。

I g E 依存性 H R F をコードする D N A に実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、I g E 依存性 H R F をコードする D N A に相補的な塩基配列（すなわち、本発明の D N A の相補鎖）の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約 7 0 % 以上、好ましくは約 8 0 % 以上、より好ましくは約 9 0 % 以上、最も好ましくは約 9 5 % 以上の相同性を有する塩基配列などがあげられる。特に、I g E 依存性 H R F をコードする D N A の相補鎖の全塩基配列うち、I g E 依存性 H R F の N 末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）の相補鎖と約 7 0 % 以上、好ましくは約 8 0 % 以上、より好ましくは約 9 0 % 以上、最も好ましくは約 9 5 % 以上の相同性を有するアンチセンス D N A が好適である。これらのアンチセンス D N A は、公知の D N A 合成装置などを用いて製造することができる。

I g E 依存性 H R F を分解する物質としては、例えば、I g E 依存性 H R F 分解酵素などが用いられる。

I g E 依存性 H R F の分解を促進する物質としては、例えば、I g E 依存性 H R F 分解酵素の活性促進物質などが用いられる。

I g E 依存性 H R F の作用を有する物質は、I g E 依存性 H R F の作用（例、インスリン分泌阻害作用等）を有する物質であれば、特に限定されない。具体的には、I g E 依存性 H R F の作用を有する物質としては、I g E 依存性 H R F の受容体アゴニスト（I g E 依存性 H R F 自体も含まれる）またはそれをコードする D N A、I g E 依存性 H R F の作用を増強または促進する物質、I g E 依存性 H R F の発現促進物質、I g E 依存性 H R F の分解を阻害する物質などが用いられる。

I g E依存性HRFの受容体アゴニストとは、I g E依存性HRFの受容体に結合して、I g E依存性HRFと同様の作用を有する物質をいい、公知物質あるいは将来見出される新規物質の何れであってもよい。具体的には、前記したTCTP p 21、TCTP p 23、TCTP p 26などが用いられる。

TCTP p 21、TCTP p 23、TCTP p 26などのI g E依存性HRFをコードするDNAとしては、前記と同様のものが用いられる。

I g E依存性HRFの作用を増強または促進する物質としては、I g E依存性HRFのインスリン分泌阻害作用等を直接的または間接的に増強または促進する物質が用いられる。具体的には、I g E依存性HRFとI g E依存性HRF受容体との結合を促進する物質、I g E依存性HRFを活性化する物質、I g E依存性HRFの安定性を増強する物質などが挙げられる。

I g E依存性HRFの発現促進物質とは、前記したI g E依存性HRFの発現を促進する物質であれば特に限定されないが、例えば、I g E依存性HRF遺伝子の発現促進物質、I g E依存性HRF遺伝子のプロモーター活性化物質、I g E依存性HRF mRNAの発現促進物質、I g E依存性HRF mRNAの翻訳促進物質、I g E依存性HRFの分泌促進物質などが用いられる。

I g E依存性HRFの分解を阻害する物質としては、例えば、I g E依存性HRF分解酵素の阻害物質などが用いられる。

上記したI g E依存性HRF、I g E依存性HRFの作用を阻害する物質、I g E依存性HRFの作用を有する物質は塩を形成していてもよく、酸または塩基との生理学的に許容される塩が挙げられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

I g E依存性HRFは新たなインスリン分泌抑制因子であり、かつ炎症惹起因子としても知られている。したがって、I g E依存性HRFの作用を阻害する物質はインスリン分泌促進薬または糖尿病の予防・治療薬として有用である。

具体的には、I g E依存性HRFの作用を阻害する物質を含有する医薬組成物

は、インスリン分泌不全（分泌阻害）に起因する疾病、例えば、糖尿病、耐糖能障害、ケトーシス、アシドーシス、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、高脂血症、性機能障害、皮膚疾患、関節症、骨減少症などの予防・治療剤として使用することができる。

特に、I g E依存性HRFまたはその作用を阻害する物質を含有する医薬組成物は糖尿病の予防・治療剤として有用である。糖尿病には、インスリン依存型（I型）糖尿病、インスリン非依存型（II型）糖尿病などが含まれる。

一方、I g E依存性HRFまたはその作用を有する物質はインスリン分泌阻害薬、インスリン合成阻害薬として有用である。インスリン分泌阻害には、インスリンの正常な分泌を阻害すること、インスリンの分泌異常を正常値まで下げることなどが含まれる。分泌阻害の程度としては、例えば、約10～100%、好ましくは約30%～100%である。

具体的には、I g E依存性HRFまたはその作用を有する物質を含有する医薬組成物は、インスリン過剰分泌に起因する疾病、例えば、肥満、高脂血症、2型糖尿病、低血糖症、高血圧、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、浮腫、インスリン抵抗性、不安定糖尿病、脂肪萎縮、インスリンアレルギー、インスリンノーマなどの予防・治療剤として使用することができる。

上記医薬組成物は、哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ウシ、ヒツジ、サル、ヒト等）に対して、安全に使用することができる。

上記医薬組成物は、医薬製剤の製造法で一般的に用いられている自体公知の手段に従って、I g E依存性HRFの作用を阻害する物質またはI g E依存性HRFもしくはその作用を有する物質をそのまま、あるいは薬理学的に許容される担体と混合して、例えば、錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、散剤、顆粒剤、カプセル剤、（ソフトカプセルを含む）、液剤、注射剤、坐剤、徐放剤等の医薬製剤として、経口的または非経口的（例、局所、直腸、静脈投与等）に安全に投与することができる。

I g E依存性HRFをコードするDNAまたはアンチセンスDNAを上記の治療・予防剤として使用する場合は、該DNAを単独あるいはレトロウイルスベク

ター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトまたは温血動物に投与することができる。アンチセンスDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やヒドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

I g E依存性HRFの作用を阻害する物質またはI g E依存性HRFもしくはその作用を有する物質の医薬組成物中の含有量は、製剤全体の約0.01ないし約100重量%である。

I g E依存性HRFの作用を阻害する物質またはI g E依存性HRFもしくはその作用を有する物質以外の成分の医薬組成物中の含有量は、製剤全体の約10ないし約99.9重量%である。

本発明のI g E依存性HRFの作用を阻害する物質またはI g E依存性HRFもしくはその作用を有する物質を含有する医薬組成物は、他の糖尿病治療剤、糖尿病性合併症治療剤、高脂血症治療剤、降圧剤、抗肥満剤、利尿剤、化学療法剤、免疫療法剤などの薬剤（以下、併用薬剤と略記することがある）と組み合わせて用いることができる。この際、本発明製剤および併用薬剤の投与時期は限定されず、これらを投与対象に対し、同時に投与してもよいし、時間差をおいて投与してもよい。併用薬剤の投与量は、临床上用いられている用量を基準として適宜選択することができる。また、本発明の医薬組成物に用いられるI g E依存性HRFの作用を阻害する物質またはI g E依存性HRFもしくはその作用を有する物質と併用薬剤の配合比は、投与対象、投与ルート、対象疾患、症状、組み合わせなどにより適宜選択することができる。例えば投与対象がヒトである場合、I g E依存性HRFの作用を阻害する物質1重量部に対し、併用薬剤を0.01～100重量部用いればよい。

他の糖尿病治療剤としては、インスリン製剤（例、ウシ、ブタの膵臓から抽出された動物インスリン製剤；大腸菌、イーストを用い、遺伝子工学的に合成したヒトインスリン製剤；インスリン亜鉛；プロタミンインスリン亜鉛；インスリンのフラグメントまたは誘導体（例、INS-1等）など）、インスリン感受性増強剤（例、塩酸ピオグリタゾン、ログリタゾン、ロジグリタゾンまたはそのマ

レイン酸塩、JTT-501、MCC-555、YM-440、GI-262570、KRP-297、FK-614、CS-011等)、 α -グルコシダーゼ阻害剤(例、ボグリボース、アカルボース、ミグリトール、エミグリテート等)、ビグアナイド剤(例、フェンホルミン、メトホルミン、ブホルミン等)、スルホニルウレア剤(例、トルブタミド、グリベンクラミド、グリクラジド、クロルプロパミド、トラザミド、アセトヘキサミド、グリクロピラミド、グリメピリド等)やその他のインスリン分泌促進剤(例、レパグリニド、セナグリニド、ミチグリニドまたはそのカルシウム塩水和物、GLP-1、ナテグリニド等)、ジペプチジルペプチダーゼIV阻害剤(例、NVP-DPP-278、PT-100、P32/98等)、 β 3アゴニスト(例、CL-316243、SR-58611-A、UL-TG-307、AJ-9677、AZ40140等)、アミリンアゴニスト(例、プラムリンチド等)、ホスホチロシンホスファターゼ阻害剤(例、パナジン酸等)、糖新生阻害剤(例、グリコーゲンホスホリラーゼ阻害剤、グルコース-6-ホスファターゼ阻害剤、グルカゴン拮抗剤等)、SGLT(sodium-glucose cotransporter)阻害剤(例、T-1095等)等が挙げられる。

糖尿病性合併症治療剤としては、アルドース還元酵素阻害剤(例、トルレスタット、エパルレスタット、ゼナレスタット、ゾボルレスタット、フィダレスタット(SNK-860)、ミナルレスタット(ARI-509)、CT-112等)、神経栄養因子(例、NGF、NT-3等)、AGE阻害剤(例、ALT-945、ピマゲジン、ピラトキサチン、N-フェナシルチアゾリウムプロミド(ALT-766)、EXO-226等)、活性酸素消去薬(例、チオクト酸等)、脳血管拡張剤(例、チオプリド等)等が挙げられる。

抗高脂血剤としては、コレステロール合成阻害剤であるスタチン系化合物(例、プラバスタチン、シンバスタチン、ロバスタチン、アトルバスタチン、フルバスタチン、セリバスタチンまたはそれらの塩(例、ナトリウム塩等)等)、スクアレン合成酵素阻害剤あるいはトリグリセリド低下作用を有するフィブラート系化合物(例、ベザフィブラート、クロフィブラート、シムフィブラート、クリノフィブラート等)等が挙げられる。

降圧剤としては、アンジオテンシン変換酵素阻害剤（例、カプトプリル、エナラプリル、デラプリル等）、アンジオテンシン II 拮抗剤（例、ロサルタン、カンデサルタン、シレキセチル等）、カルシウム拮抗剤（例、マニジピン、ニフェジピン、アムロジピン、エホニジピン、ニカルジピン等）、クロニジン等が挙げられる。

抗肥満剤としては、例えば中枢性抗肥満薬（例、デキスフェンフルアミン、フェンフルラミン、フェンテルミン、シブトラミン、アンフェプラモン、デキサメフェタミン、マジンドール、フェニルプロパノールアミン、クロベンゾレックス等）、勝リパーゼ阻害薬（例、オルリスタット等）、 β 3 アゴニスト（例、CL-316243、SR-58611-A、UL-TG-307、AJ-9677、AZ40140等）、ペプチド性食欲抑制薬（例、レプチン、CNTF（毛様体神経栄養因子）等）、コレシストキニンアゴニスト（例、リンチトリプト、FPL-15849等）等が挙げられる。

利尿剤としては、例えばキサンチン誘導体（例、サリチル酸ナトリウムテオブロミン、サリチル酸カルシウムテオブロミン等）、チアジド系製剤（例、エチアジド、シクロペンチアジド、トリクロルメチアジド、ヒドロクロロチアジド、ヒドロフルメチアジド、ベンジルヒドロクロロチアジド、ペンフルチジド、ポリチアジド、メチクロチアジド等）、抗アルドステロン製剤（例、スピロノラクトン、トリアムテレン等）、炭酸脱水酵素阻害剤（例、アセタゾラミド等）、クロルベンゼンスルホンアミド系製剤（例、クロルタリドン、メフルシド、インダパミド等）、アゾセミド、イソソルビド、エタクリン酸、ピレタニド、ブメタニド、フロセミド等が挙げられる。

化学療法剤としては、例えばアルキル化剤（例、サイクロフォスファミド、イフォスファミド等）、代謝拮抗剤（例、メソトレキセート、5-フルオロウラシル等）、抗癌性抗生物質（例、マイトマイシン、アドリアマイシン等）、植物由来抗癌剤（例、ビンクリスチン、ビンデシン、タキソール等）、シスプラチン、カルボプラチン、エトポキシドなどが挙げられる。なかでも5-フルオロウラシル誘導体であるフルツロンあるいはネオフルツロンなどが好ましい。

免疫療法剤としては、例えば微生物または細菌成分（例、ムラミルジペプチド

誘導体、ピシバニール等)、免疫増強活性のある多糖類 (例、レンチナン、シゾフィラン、クレスチン等)、遺伝子工学的手法で得られるサイトカイン (例、インターフェロン、インターロイキン (IL) 等)、コロニー刺激因子 (例、顆粒球コロニー刺激因子、エリスロポエチン等) などが挙げられ、なかでも IL-1、IL-2、IL-12 などが好ましい。

さらに、動物モデルや臨床で悪液質改善作用が認められている薬剤、すなわち、シクロオキシゲナーゼ阻害剤 (例、インドメタシン等) [キャンサー・リサーチ (Cancer Research)、第 49 巻、5935～5939 頁、1989 年]、プロゲステロン誘導体 (例、メゲステロールアセテート) [ジャーナル・オブ・クリニカル・オンコロジー (Journal of Clinical Oncology)、第 12 巻、213～225 頁、1994 年]、糖質ステロイド (例、デキサメサゾン等)、メトクロプラミド系薬剤、テトラヒドロカンナビノール系薬剤 (文献はいずれも上記と同様)、脂肪代謝改善剤 (例、エイコサペンタエン酸等) [ブリティッシュ・ジャーナル・オブ・キャンサー (British Journal of Cancer)、第 68 巻、314～318 頁、1993 年]、成長ホルモン、IGF-1、あるいは悪液質を誘導する因子である TNF- α 、LIF、IL-6、オンコスタチン M に対する抗体なども本発明製剤と併用することができる。

さらに、糖化阻害剤 (例、ALT-711 等)、神経再生促進薬 (例、Y-128、VX853、prosaptide 等)、抗うつ薬 (例、デシプラミン、アミトリプチリン、イミプラミン)、抗てんかん薬 (例、ラモトリジン)、抗不整脈薬 (例、メキシレチン)、アセチルコリン受容体リガンド (例、ABT-594)、エンドセリン受容体拮抗薬 (例、ABT-627)、モノアミン取り込み阻害薬 (例、トラマドル)、麻薬性鎮痛薬 (例、モルヒネ)、GABA 受容体作動薬 (例、ギャバペンチン)、 $\alpha 2$ 受容体作動薬 (例、クロニジン)、局所鎮痛薬 (例、カプサイシン)、プロテインキナーゼ C 阻害剤 (例、LY-333531)、抗不安薬 (例、ベンゾチアゼピン)、ホスホジエステラーゼ阻害薬 (例、シルデナフィル)、ドーパミン受容体作動薬 (例、アポモルフィン) など本発明製剤と併用することができる。

本発明製剤と前記併用薬剤とを併用することにより、例えば本発明製剤または併用薬剤の作用増強効果；本発明製剤または併用薬剤の投与量の低減効果；本発

明製剤または併用薬剤の副作用の低減効果などの優れた効果が得られる。

上記医薬組成物の製造に用いられてもよい薬理学的に許容される担体としては、製剤素材として慣用の各種有機あるいは無機担体物質が挙げられ、例えば固形製剤における賦形剤、滑沢剤、結合剤および崩壊剤、あるいは液状製剤における溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤および無痛化剤等が挙げられる。更に必要に応じ、通常の防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤、吸着剤、湿潤剤等の添加物を適宜、適量用いることもできる。

賦形剤としては、例えば乳糖、白糖、D-マンニトール、デンプン、コーンスターチ、結晶セルロース、軽質無水ケイ酸等が挙げられる。

滑沢剤としては、例えばステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、タルク、コロイドシリカ等が挙げられる。

結合剤としては、例えば結晶セルロース、白糖、D-マンニトール、デキストリン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、デンプン、ショ糖、ゼラチン、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム等が挙げられる。

崩壊剤としては、例えばデンプン、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、カルボキシメチルスターチナトリウム、L-ヒドロキシプロピルセルロース等が挙げられる。

溶剤としては、例えば注射用水、アルコール、プロピレングリコール、マクロゴール、ゴマ油、トウモロコシ油、オリーブ油等が挙げられる。

溶解補助剤としては、例えばポリエチレングリコール、プロピレングリコール、D-マンニトール、安息香酸ベンジル、エタノール、トリスアミノメタン、コレステロール、トリエタノールアミン、炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム等が挙げられる。

懸濁化剤としては、例えばステアリルトリエタノールアミン、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアミノプロピオン酸、レシチン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、モノステアリン酸グリセリン、等の界面活性剤；例えばポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセル

ローズ、ヒドロキシプロピルセルローズ等の親水性高分子等が挙げられる。

等張化剤としては、例えばブドウ糖、D-ソルビトール、塩化ナトリウム、グリセリン、D-マンニトール等が挙げられる。

緩衝剤としては、例えばリン酸塩、酢酸塩、炭酸塩、クエン酸塩等の緩衝液等が挙げられる。

無痛化剤としては、例えばベンジルアルコール等が挙げられる。

防腐剤としては、例えばパラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソルビン酸等が挙げられる。

抗酸化剤としては、例えば亜硫酸塩、アスコルビン酸、 α -トコフェロール等が挙げられる。

本発明の医薬組成物の投与量は、投与対象、投与ルート、疾患、症状等により異なるが、例えば、I g E依存性HRFの作用を阻害する物質を糖尿病治療に用いる場合、患者（体重約60 kg）に対し、1日当たり有効成分（I g E依存性HRFの作用を阻害する物質）として約0.01ないし約100 mg/kg 体重、好ましくは約0.01ないし約30 mg/kg 体重、更に好ましくは約1ないし約20 mg/kg 体重を1日1ないし数回に分けて経口投与すればよい。

I g E依存性HRFは新たなインスリン分泌抑制因子であるので、I g E依存性HRFおよび（または）その受容体、I g E依存性HRFをコードするDNAおよび（または）その受容体をコードするDNAはインスリン分泌調節物質のスクリーニングに有用である。

インスリン分泌調節物質としては、I g E依存性HRFとI g E依存性HRF受容体との結合性を変化させる化合物（例、アゴニスト、アンタゴニストなど）、I g E依存性HRFまたはI g E依存性HRF受容体の発現量を変化させる化合物などが挙げられる。

(1) I g E依存性HRFとI g E依存性HRF受容体との結合性を変化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニストなど）のスクリーニング方法

I g E依存性HRFとI g E依存性HRF受容体との結合性を変化させる化合物には、(イ) I g E依存性HRF受容体を介して細胞刺激活性（例えば、アラ

キドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下などを促進する活性または抑制する活性などを有する化合物（いわゆる、IgE 依存性 HRF 受容体アゴニスト）、(ロ) 該細胞刺激活性を有しない化合物（いわゆる、IgE 依存性 HRF 受容体アンタゴニスト）、(ハ) IgE 依存性 HRF と IgE 依存性 HRF 受容体との結合力を増強する化合物、または (ニ) IgE 依存性 HRF と IgE 依存性 HRF 受容体との結合力を減少させる化合物などが含まれる。

すなわち、本発明は、

[1] (i) IgE 依存性 HRF とその受容体とを接触させた場合と、(ii) IgE 依存性 HRF とその受容体および試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする IgE 依存性 HRF と IgE 依存性 HRF 受容体との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のスクリーニング方法においては、(i) と (ii) の場合における、例えば、IgE 依存性 HRF 受容体に対する IgE 依存性 HRF の結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較することを特徴とする。

より具体的には、本発明は、

[2] (i) 標識した IgE 依存性 HRF を IgE 依存性 HRF 受容体に接触させた場合と、(ii) 標識した IgE 依存性 HRF および試験化合物を IgE 依存性 HRF 受容体に接触させた場合における、標識した IgE 依存性 HRF の IgE 依存性 HRF 受容体に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする IgE 依存性 HRF と IgE 依存性 HRF 受容体との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

[3] (i) 標識した IgE 依存性 HRF を IgE 依存性 HRF 受容体を含有する細胞に接触させた場合と、(ii) 標識した IgE 依存性 HRF および試験化合物を IgE 依存性 HRF 受容体を含有する細胞に接触させた場合における、標識した IgE 依存性 HRF の該細胞に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする IgE 依存性 HRF と IgE 依存性 HRF 受容体との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

〔４〕（ｉ）標識した I g E 依存性 H R F を I g E 依存性 H R F 受容体を含有する細胞の膜面分に接触させた場合と、（ii）標識した I g E 依存性 H R F および試験化合物を I g E 依存性 H R F 受容体を含有する細胞の膜面分に接触させた場合における、標識した I g E 依存性 H R F の該細胞に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする I g E 依存性 H R F と I g E 依存性 H R F 受容体との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

〔５〕（ｉ） I g E 依存性 H R F 受容体を活性化する化合物を I g E 依存性 H R F 受容体を含有する細胞に接触させた場合と、（ii） I g E 依存性 H R F 受容体を活性化する化合物および試験化合物を I g E 依存性 H R F 受容体を含有する細胞に接触させた場合における、 I g E 依存性 H R F 受容体を介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $C a^{2+}$ 遊離、細胞内 c A M P 生成、細胞内 c G M P 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c - f o s の活性化、p H の低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とする I g E 依存性 H R F と I g E 依存性 H R F 受容体との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

I g E 依存性 H R F としては、前記した I g E 依存性 H R F やその部分ペプチドと同様のものが用いられる。

I g E 依存性 H R F 受容体を活性化する化合物としては、例えば、T C T P p 2 1、T C T P p 2 3、T C T P p 2 6 などが用いられる。

I g E 依存性 H R F 受容体としては、I g E 依存性 H R F 受容体を含有するものであれば何れのものであってもよいが、I g E 依存性 H R F を含有する細胞（例、膵臓の β 細胞、M I N 6 細胞など）、哺乳動物の臓器（例、膵臓）の細胞膜面分などが好適である。

しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させたヒト由来の I g E 依存性 H R F またはその受容体等などが適している。

I g E 依存性 H R F 受容体を製造するには、I g E 依存性 H R F 受容体の D N

Aを哺乳細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とするI g E依存性HR F受容体部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。I g E依存性HR F受容体をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus ; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV 40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。

発現した受容体の量と質の検査はそれ自体公知の方法で行なうことができる。例えば、文献 [Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 267 巻, 19555~19559 頁, 1992 年] に記載の方法に従って行なうことができる。

したがって、本発明のスクリーニング方法において、I g E依存性HR F受容体を含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製したI g E依存性HR F受容体であってもよいし、I g E依存性HR F受容体を含有する細胞を用いてもよく、またI g E依存性HR F受容体を含有する細胞の膜画分を用いてもよい。

本発明のスクリーニング方法において、I g E依存性HR F受容体を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行なうことができる。

I g E依存性HR F受容体を含有する細胞としては、I g E依存性HR F受容体を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが好ましい。

細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem 型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica 社製) のよる破碎、超音波による破碎、フレンチプレス

などで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500rpm～3000rpm）で短時間（通常、約1分～10分）遠心し、上清をさらに高速（15000rpm～30000rpm）で通常30分～2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したIgE依存性HRF受容体と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

IgE依存性HRF受容体を含有する細胞や膜画分中のレセプター蛋白質の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

IgE依存性HRFとIgE依存性HRF受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする上記〔1〕～〔4〕を実施するためには、例えば、適当なIgE依存性HRF受容体画分と標識したIgE依存性HRFが必要である。

IgE依存性HRF受容体画分としては、天然型のIgE依存性HRF受容体画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型IgE依存性HRF受容体画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

標識したIgE依存性HRFとしては、標識したIgE依存性HRF、標識したIgE依存性HRFアナログ化合物などが用いられる。例えば $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識されたIgE依存性HRFなどが用いられる。

具体的には、IgE依存性HRFとIgE依存性HRF受容体との結合性を変化させる化合物のスクリーニングを行なうには、まずIgE依存性HRF受容体を含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりIgE依存性HRF受容体を調製する。バッファーには、pH4～10（望ましくはpH6～8）のリン酸バッファー、トリス塩酸バッファーなどのIgE依存性HRFとIgE依存性HRF受容体との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、

CHAPS、Tween-80™（花王-アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるIgE依存性HRFやIgE依存性HRF受容体の分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml～10mlの該レセプター溶液に、一定量（5000cpm～500000cpm）の標識したIgE依存性HRFを添加し、同時に 10^{-4}M ～ 10^{-10}M の試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知るために大過剰の未標識のIgE依存性HRFを加えた反応チューブも用意する。反応は約0℃から50℃、望ましくは約4℃から37℃で、約20分から24時間、望ましくは約30分から3時間行なう。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたはγ-カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント(B_0)から非特異的結合量（NSB）を引いたカウント($B_0 - \text{NSB}$)を100%とした時、特異的結合量($B - \text{NSB}$)が、例えば、50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

IgE依存性HRFとIgE依存性HRF受容体との結合性を変化させる化合物スクリーニングする上記〔5〕の方法を実施するためには、例えば、IgE依存性HRF受容体を介する細胞刺激活性、例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性などを公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。

具体的には、まず、IgE依存性HRF受容体を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検

定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当なIgE依存性HRF受容体を発現した細胞が必要である。IgE依存性HRF受容体を発現した細胞としては、天然型のIgE依存性HRF受容体を有する細胞株、組換え型IgE依存性HRFを発現した細胞株などが望ましい。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、蛋白、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが用いられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

IgE依存性HRFとIgE依存性HRF受容体との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、IgE依存性HRF、IgE依存性HRF受容体、IgE依存性HRF受容体を含有する細胞、IgE依存性HRF受容体を含有する細胞の膜面分などを含有するものなどである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. スクリーニング用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

孔径0.45 μ mのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②IgE依存性HRF受容体標品

IgE依存性HRF受容体を含有するMIN6細胞を、12穴プレートに 5×10^5 個/穴で継代し、37℃、5%CO₂、95%airで2日間培養したもの。

③標識IgE依存性HRF

市販の [³H]、[¹²⁵I]、[¹⁴C]、[³⁵S] などと標識したIgE依存性HRF

水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1 μ Mに希釈する。

④ I g E 依存性 H R F 標準液

I g E 依存性 H R F を 0.1 % ウシ血清アルブミン（シグマ社製）を含む P B S で 1 m M となるように溶解し、 -20°C で保存する。

2. 測定法

① 12 穴組織培養用プレートにて培養した I g E 依存性 H R F 受容体含有 M I N 6 細胞を、測定用緩衝液 1 m l で 2 回洗浄した後、 $490\mu\text{l}$ の測定用緩衝液を各穴に加える。

② $10^{-3} \sim 10^{-10}\text{M}$ の試験化合物溶液を $5\mu\text{l}$ 加えた後、標識 I g E 依存性 H R F を $5\mu\text{l}$ 加え、室温にて 1 時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物の代わりに 10^{-3}M の I g E 依存性 H R F を $5\mu\text{l}$ 加えておく。

③ 反応液を除去し、1 m l の洗浄用緩衝液で 3 回洗浄する。細胞に結合した標識 I g E 依存性 H R F を 0.2 N N a O H - 1 % S D S で溶解し、4 m l の液体シンチレーター A（和光純薬製）と混合する。

④ 液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB) を次の式で求める。

$$\text{PMB} = [(B - \text{NSB}) / (B_0 - \text{NSB})] \times 100$$

PMB : Percent Maximum Binding

B : 検体を加えた時の値

NSB : Non-specific Binding (非特異的結合量)

B_0 : 最大結合量

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、I g E 依存性 H R F と I g E 依存性 H R F 受容体との結合性を変化させる作用等を有することによって、インスリン分泌を調節する化合物であり、具体的には、(イ) I g E 依存性 H R F 受容体アゴニスト、(ロ) I g E 依存性 H R F 受容体アンタゴニスト、(ハ) I g E 依存性 H R F と I g E 依存性 H R F 受容体との結合力を増強する化合物または (ニ) I g E 依存性 H R F と I g E 依存性 H R F 受容体との結合力を減少させる化合物である。

該化合物としては、ペプチド、蛋白、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の

化合物であってもよい。

I g E 依存性HRF 受容体に対するアゴニストおよび I g E 依存性HRF と I g E 依存性HRF 受容体との結合力を増強する化合物は、I g E 依存性HRF が有する作用（例、インスリン分泌阻害作用）と同様の作用を有しているので、前記したインスリン過剰分泌に起因する疾患に対する安全で低毒性な医薬として有用である。

一方、I g E 依存性HRF 受容体に対するアンタゴニストおよび I g E 依存性HRF と I g E 依存性HRF 受容体との結合力を減少させる化合物は、I g E 依存性HRF が有する作用を阻害することができるので、前記したインスリン分泌不全（分泌阻害）に起因する疾患、糖尿病などに対する安全で低毒性な医薬として有用である。

(2) I g E 依存性HRF または I g E 依存性HRF 受容体の発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法

I g E 依存性HRF をコードするDNA および（または）I g E 依存性HRF 受容体をコードするDNA をプローブとして用いることにより、I g E 依存性HRF または I g E 依存性HRF 受容体の発現量を変化させる化合物のスクリーニングに用いることができる。

すなわち、本発明は、例えば、(i) 非ヒト哺乳動物の①血液、②特定の臓器、③臓器から単離した組織もしくは細胞または (ii) 形質転換体に含まれる I g E 依存性HRF または I g E 依存性HRF 受容体のmRNA 量を測定することによる、I g E 依存性HRF または I g E 依存性HRF 受容体の発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

より具体的には、被検化合物の存在下および非存在下に、(i) 非ヒト哺乳動物の①血液、②特定の臓器、③臓器から単離した組織もしくは細胞または (ii) 形質転換体に含まれる I g E 依存性HRF または I g E 依存性HRF 受容体のmRNA 量を測定し、比較することにより、I g E 依存性HRF または I g E 依存性HRF 受容体の発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

I g E 依存性HRF または I g E 依存性HRF 受容体のmRNA 量の測定は具体的には以下のようにして行なう。

(i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には痴呆ラット、肥満マウス、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど）に対して、薬剤（例えば、抗痴呆薬、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など）あるいは物理的ストレス（例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など）などを与え、一定時間経過した後に、血液あるいは特定の臓器（例えば、膵臓など）または臓器から単離した組織（例、ランゲルハンス島）あるいは細胞（例、膵臓β細胞、MIN6細胞）を得る。

得られた血液等に含まれるIgE依存性HRFまたはIgE依存性HRF受容体のmRNAは、例えば、通常の方法により細胞等からmRNAを抽出し、例えば、TaqManPCRなどの手法を用いることにより定量することができ、自体公知の手段によりノーザンブロットを行なうことにより解析することもできる。

(ii) IgE依存性HRF受容体を発現する形質転換体を作製し、該形質転換体に含まれるIgE依存性HRF受容体のmRNAを同様にして定量、解析することができる。

より具体的には、IgE依存性HRFまたはIgE依存性HRF受容体の発現量を変化させる物質のスクリーニングは、

(i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物に対して、薬剤あるいは物理的ストレスなどを与える一定時間前（30分前～24時間前、好ましくは30分前～12時間前、より好ましくは1時間前～6時間前）もしくは一定時間後（30分後～3日後、好ましくは1時間後～2日後、より好ましくは1時間後～24時間後）、または薬剤あるいは物理的ストレスと同時に被検化合物を投与し、投与後一定時間経過後（30分後～3日後、好ましくは1時間後～2日後、より好ましくは1時間後～24時間後）、細胞に含まれるIgE依存性HRFまたはIgE依存性HRF受容体のmRNA量を定量、解析することにより行なうことができ、

(ii) 形質転換体を常法に従い培養する際に被検化合物を培地中に混合させ、一定時間培養後（1日後～7日後、好ましくは1日後～3日後、より好ましくは2日後～3日後）、該形質転換体に含まれるIgE依存性HRF受容体のmRNA量を定量、解析することにより行なうことができる。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる物質は、I g E依存性H R FまたはI g E依存性H R F受容体の発現量を変化させる作用を有する物質であり、具体的には、(イ) I g E依存性H R FまたはI g E依存性H R F受容体の発現量を増加させることにより、I g E依存性H R F受容体を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内C a ²⁺遊離、細胞内c A M P生成、細胞内c G M P生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c - f o sの活性化、p Hの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を増強させる物質、(ロ) I g E依存性H R FまたはI g E依存性H R F受容体の発現量を減少させることにより、該細胞刺激活性を減弱させる物質である。

該物質としては、ペプチド、蛋白、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

該細胞刺激活性を増強させる物質は、I g E依存性H R Fが有する作用（例、インスリン分泌阻害作用）と同様の作用を有しているので、前記したインスリン過剰分泌に起因する疾患に対する安全で低毒性な医薬として有用である。

該細胞刺激活性を減弱させる物質は、I g E依存性H R Fが有する作用を阻害することができるので、前記したインスリン分泌不全（分泌阻害）に起因する疾患、糖尿病などに対する安全で低毒性な医薬として有用である。

上記した本発明のスクリーニング方法を用いて得られる物質を医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、上記したI g E依存性H R Fの作用を阻害する物質またはI g E依存性H R Fもしくはその作用を有する物質を含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

また、該細胞刺激活性を増強させる物質または該細胞刺激活性を減弱させる物質を含有してなるインスリン分泌不全（分泌阻害）に起因する疾患や糖尿病の予防・治療剤は、前記した糖尿病治療剤、糖尿病性合併症治療剤、高脂血症治療剤、降圧剤、抗肥満剤、利尿剤、化学療法剤、免疫療法剤などの薬剤と組み合わせて用いることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる I g E 依存性 H R F または I g E 依存性 H R F 受容体の発現量を変化させる作用を有する物質の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に、例えば、該細胞刺激活性を減弱させる化合物を糖尿病の治療に用いる場合、患者（60 kg として）においては、一日につき約 0.1～100 mg、好ましくは約 1.0～50 mg、より好ましくは約 1.0～20 mg である。非経口的に投与する場合は、その 1 回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では、通常、糖尿病患者（60 kg として）においては、一日につき約 0.01～30 mg 程度、好ましくは約 0.1～20 mg 程度、より好ましくは約 0.1～10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当たりに換算した量を投与することができる。

I g E 依存性 H R F に対する抗体は、I g E 依存性 H R F に対して結合性を有しているので、生体内における I g E 依存性 H R F 濃度を感度良く定量することができるので、インスリン分泌異常の診断に有用である。

I g E 依存性 H R F に対する抗体を含有してなるインスリン分泌異常の診断剤は、I g E 依存性 H R F に対する抗体の他に、抗原の定量に必要な一般的な添加剤を含んでいてもよい。

I g E 依存性 H R F の定量法は、例えば、競合法、サンドイッチ免疫測定法などと組み合わせることによって用いることができる。すなわち、被検体を本発明のレセプター蛋白質等と接触させることによって被検体中の I g E 依存性 H R F 濃度を測定することができる。

具体的には、

(i) I g E 依存性 H R F に対する抗体（H R F 抗体）と、被検液および標識化された I g E 依存性 H R F とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された I g E 依存性 H R F の割合を測定することを特徴とする被検液中の I g E 依存

性HRFの定量法、および

(ii) 被検液と担体上に不溶化したHRF抗体および標識化された別のHRF抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中のIgE依存性HRFの定量法などが用いられる。

上記(ii)の定量法においては、一方の抗体がIgE依存性HRFのN端部を認識する抗体で、他方の抗体がIgE依存性HRFのC端部に反応する抗体であることが望ましい。

また、IgE依存性HRFに対するモノクローナル抗体を用いてIgE依存性HRFの定量を行なうことができるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(ab')₂、Fab'、あるいはFab画分を用いてもよい。

HRF抗体を用いる定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、ペプチド量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、[¹²⁵I]、[¹³¹I]、[³H]、[¹⁴C]などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、β-ガラクトシダーゼ、β-グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常ペプチドあるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等があげられる。

サンドイッチ法においては不溶化したHRFモノクローナル抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した別のHRFモノクローナル抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中のIgE依存性HRF量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行なっても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

サンドイッチ法によるIgE依存性HRFの測定法においては、1次反応と2次反応に用いられるHRFモノクローナル抗体は、IgE依存性HRFの結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、IgE依存性HRFのC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

HRFモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。

競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原（F）と、抗体と結合した標識抗原（B）とを分離し（B/F分離）、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用地第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の方法、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のペプチドの測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D : Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E : Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I : Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))(以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができる。

以上のようにして、HRF抗体を用いることによって、IgE依存性HRFを感度良く定量することができる。

さらには、HRF抗体を用いてIgE依存性HRFの濃度の増加が検出された

場合には、例えば、糖尿病、耐糖能障害、ケトーシス、アシドーシス、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、高脂血症、性機能障害、皮膚疾患、関節症、骨減少症などの疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、H R F 抗体を用いて I g E 依存性H R F の濃度を定量することによって、I g E 依存性H R F の濃度の減少が検出された場合、例えば、肥満、高脂血症、2型糖尿病、低血糖症、高血圧、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、浮腫、インスリン抵抗性、不安定糖尿病、脂肪萎縮、インスリンアレルギー、インスリノーマなどの疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、H R F 抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する I g E 依存性H R F を検出するために使用することができる。また、I g E 依存性H R F を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の I g E 依存性H R F の検出、被検細胞内における I g E 依存性H R F の挙動の分析などのために使用することができる。

I g E 依存性H R F をコードするD N A は、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）における I g E 依存性H R F をコードするD N A またはm R N A の異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該D N A またはm R N A の損傷、突然変異あるいは発現低下や、該D N A またはm R N A の増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。

I g E 依存性H R F をコードするD N A を用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやP C R - S S C P 法（ゲノミクス (Genomics), 第5巻, 874～879頁 (1989年)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ユーエスエー (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America), 第86巻, 2766～2770頁 (1989年)) などにより実施することができる。

例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより I g E 依存性 H R F の発現過多が検出された場合は、例えば、糖尿病、耐糖能障害、ケトーシス、アシドーシス、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、高脂血症、性機能障害、皮膚疾患、関節症、骨減少症などである可能性が高い、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、ノーザンハイブリダイゼーションにより I g E 依存性 H R F の発現低下が検出された場合は、例えば、肥満、高脂血症、2型糖尿病、低血糖症、高血圧、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、浮腫、インスリン抵抗性、不安定糖尿病、脂肪萎縮、インスリンアレルギー、インスリノーマなどである可能性が高い、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

実施例

本発明は、更に以下の実施例および実験例によって詳しく説明されるが、これらの例は単なる実施であって、本発明を限定するものではなく、また本発明の範囲を逸脱しない範囲で変化させてもよい。

なお、大腸菌を用いての遺伝子クローニングは、モレキュラー・クローニング (Molecular cloning) に記載されている方法に従った。

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、I U P A C - I U B Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

D N A	: デオキシリボ核酸
c D N A	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
m R N A	: メッセンジャーリボ核酸
G l y	: グリシン

A l a	: アラニン
V a l	: バリン
L e u	: ロイシン
I l e	: イソロイシン
S e r	: セリン
T h r	: スレオニン
C y s	: システイン
M e t	: メチオニン
G l u	: グルタミン酸
A s p	: アスパラギン酸
L y s	: リジン
A r g	: アルギニン
H i s	: ヒスチジン
P h e	: フェニルアラニン
T y r	: チロシン
T r p	: トリプトファン
P r o	: プロリン
A s n	: アスパラギン
G l n	: グルタミン

[配列番号 : 1]

T C T P p 2 1 のアミノ酸配列を示す。

[配列番号 : 2]

T C T P p 2 3 のアミノ酸配列を示す。

[配列番号 : 3]

T C T P p 2 6 のアミノ酸配列を示す。

[配列番号 : 4]

T C T P p 2 1 をコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号 : 5]

T C T P p 2 3 をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：6〕

TCTP p 26 をコードするDNAの塩基配列を示す。

実施例 1

- | | |
|------------------------------|--------|
| (1) I g E 依存性HRFの作用を阻害する化合物A | 1 0 mg |
| (2)乳糖 | 6 0 mg |
| (3)コーンスターチ | 3 5 mg |
| (4)ゼラチン | 3 mg |
| (5)ステアリン酸マグネシウム | 2 mg |

化合物A 1 0 mg と乳糖 6 0 mg およびコーンスターチ 3 5 mg の混合物を 1 0 %ゼラチン水溶液 0. 0 3 ml (ゼラチンとして 3 mg) を用い、1 mm メッシュの篩を通して顆粒化した後、4 0℃で乾燥し再び篩過する。かくして得られる顆粒をステアリン酸マグネシウム 2 mg と混合し、圧縮する。得られる中心錠を、蔗糖、二酸化チタン、タルクおよびアラビアゴムの水懸液による糖衣でコーティングする。コーティングが施された錠剤をミツロウで艶出してコート錠を得る。

実施例 2

- | | |
|------------------------------|--------|
| (1) I g E 依存性HRFの作用を阻害する化合物A | 1 0 mg |
| (2)乳糖 | 7 0 mg |
| (3)コーンスターチ | 5 0 mg |
| (4)可溶性デンプン | 7 mg |
| (5)ステアリン酸マグネシウム | 3 mg |

化合物A 1 0 mg とステアリン酸マグネシウム 3 mg を可溶性デンプンの水溶液 0. 0 7 ml (可溶性デンプンとして 7 mg) で顆粒化した後、乾燥し、乳糖 7 0 mg およびコーンスターチ 5 0 mg と混合する。混合物を圧縮して錠剤を得る。

実施例 3

- | | |
|------------------------------|-------------|
| (1) I g E 依存性HRFの作用を阻害する化合物A | 5 mg |
| (2)食塩 | 2 0 mg |
| (3)蒸留水 | 全量 2 ml とする |

化合物A 5 mg および食塩 2 0 mg を蒸留水に溶解させ、水を加えて全量 2 ml とする。溶液をろ過し、無菌条件下に 2 ml のアンプルに充填する。アンプルを滅菌した

後、密封し注射用溶液を得る。

実施例 4

- | | |
|----------------------------------|--------|
| (1) I g E 依存性 H R F の作用を有する化合物 B | 1 0 mg |
| (2) 乳糖 | 6 0 mg |
| (3) コーンスターチ | 3 5 mg |
| (4) ゼラチン | 3 mg |
| (5) ステアリン酸マグネシウム | 2 mg |

化合物 B 1 0 mg と乳糖 6 0 mg およびコーンスターチ 3 5 mg の混合物を 1 0 % ゼラチン水溶液 0. 0 3 ml (ゼラチンとして 3 mg) を用い、1 mm メッシュの篩を通して顆粒化した後、4 0 °C で乾燥し再び篩過する。かくして得られる顆粒をステアリン酸マグネシウム 2 mg と混合し、圧縮する。得られる中心錠を、蔗糖、二酸化チタン、タルクおよびアラビアゴムの水懸液による糖衣でコーティングする。コーティングが施された錠剤をミツロウで艶出してコート錠を得る。

実施例 5

- | | |
|----------------------------------|--------|
| (1) I g E 依存性 H R F の作用を有する化合物 B | 1 0 mg |
| (2) 乳糖 | 7 0 mg |
| (3) コーンスターチ | 5 0 mg |
| (4) 可溶性デンプン | 7 mg |
| (5) ステアリン酸マグネシウム | 3 mg |

化合物 B 1 0 mg とステアリン酸マグネシウム 3 mg を可溶性デンプンの水溶液 0. 0 7 ml (可溶性デンプンとして 7 mg) で顆粒化した後、乾燥し、乳糖 7 0 mg およびコーンスターチ 5 0 mg と混合する。混合物を圧縮して錠剤を得る。

実施例 6

- | | |
|----------------------------------|-------------|
| (1) I g E 依存性 H R F の作用を有する化合物 B | 5 mg |
| (2) 食塩 | 2 0 mg |
| (3) 蒸留水 | 全量 2 ml とする |

化合物 B 5 mg および食塩 2 0 mg を蒸留水に溶解させ、水を加えて全量 2 ml とする。溶液をろ過し、無菌条件下に 2 ml のアンプルに充填する。アンプルを滅菌した後、密封し注射用溶液を得る。

具体的には、上記の実施例 4～6 において、化合物 B として、TCTP p 2 1、TCTP p 2 3 または TCTP p 2 6 を使用する。

実験例 1

(1) 実験材料

雄性 C 5 7 B L / 6 および雄性 C 3 H / H e N マウス (日本 S L C、静岡)、ウィスター系雄性ラット (日本 S L C、静岡) ならびにハートレー系雄性モルモット (日本 S L C、静岡) から膵組織を摘出した。摂食に伴う膵臓、肝臓および血清中の TCTP p 2 1 の変化の測定には雄性 C 3 H / H e N マウスおよび C 5 7 B L / 6 マウスを用いた。

マウス膵 β 細胞株 (M I N 6 細胞) は、非動化済み牛胎児血清 (F C S、フロー社、McLean, V A) を 1 5 %、100 I U / m l ペニシリン、100 μ g / m l ストレプトマイシン、5 μ M 2-メルカプトエタノールおよび 2 5 m M グルコースを含む DMEM を用いて 3 7 $^{\circ}$ C、5 % C O ₂ - 9 5 % a i r にて培養した。なお、実験には 18～23 継代の細胞を用いた。

マウス膵ランゲルハンス島の単離は Lacy らの方法に従った。C 3 H / H e N あるいは C 5 7 B L / 6 マウスの膵臓に Hank's balanced salt solution (H B S S) を注入し、膵臓を膨らませてから摘出した。ハサミで細切後、3 7 $^{\circ}$ C、1 0 分間、2. 5 m g / m l のコラゲナーゼ S - 1 (新田ゼラチン、大阪) を含む H B S S でインキュベーションした。消化した膵細胞に H B S S を加えて 400 g、1 分間の遠心洗浄を 3 回行なった。最後に上清を除いた後、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を加えて遠心洗浄を行なった。細胞を DMEM の入ったディッシュに分散させ、顕微鏡下で 2 μ l ピペットマンにて膵ランゲルハンス島を回収した。単離した膵ランゲルハンス島は DMEM 中で 3 7 $^{\circ}$ C、5 % C O ₂ - 9 5 % a i r にて培養した。

(2) 抗 TCTP p 2 1 抗体の作成と膵臓組織の免疫組織染色

マイクロシーケンスにより得られた TCTP p 2 1 の N 末端 20 アミノ酸の塩基配列を基にペプチドを合成し、これを抗原としてウサギを免疫して抗血清を作製した。抗原として用いた合成ペプチドを固定化したアガロースビーズを作製し、得られたポリクローナル抗体をアフィニティー精製した。ヒト膵癌切除組織

のパラフィン包埋組織をミクロトームにて厚さ4 μ の切片を作成し、スライドガラス上にのせ風乾した。キシレンで脱パラフィン化した後、アルコール濃度を段階的に下げて水和し、蒸留水で5分間洗浄した。Phosphate-buffered saline (PBS) で100倍希釈したヤギ正常血清を滴下し、室温で20分間静置しブロッキングを行なった。上述の抗TCTP p21抗体(100倍希釈)で、室温、1時間反応させた。結合した抗体は、ペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgGF (ab')²抗体を結合させ、アジピン・ビオチン・ペルオキシダーゼ染色キット (Vectastain ABCキット) を用いて検出した。同時に、ヘマトキシン染色を行なった。

C57BL/6マウス(6~8週齢)から臓器を摘出し、3%ホルマリン溶液で固定し、パラフィン包埋した。包埋した組織をミクロトームにて厚さ4 μ の切片を作成し、スライドガラス上にのせ風乾した。キシレンで脱パラフィン化した後、アルコール濃度を段階的に下げて水和し、蒸留水で5分間洗浄した。PBSで100倍希釈したヤギ正常血清を滴下し、室温で20分間静置しブロッキングを行なった。1次抗体として抗インスリン抗体(100倍希釈、SANBIO Amsterdam, Netherlands)を用いて、室温で2時間反応させた。PBSで5分間、3回洗浄後、二次抗体としてローダミン標識抗マウスIgGF (ab')²抗体(100倍希釈、日本アマシャム社、東京)を用いて、室温で1.5時間反応させた後、PBSで10分間、4回洗浄した。さらに1次抗体として抗TCTP p21抗体(100倍希釈)を用いて、室温で2時間反応させた。PBSで5分間、3回洗浄後、2次抗体として fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗ウサギIgGF (ab')²抗体(100倍希釈、サンタクルーズ社、Santa Cruz、CA)を用いて、室温で1.5時間反応させた。PBSで5分間、3回洗浄後、PermaFluorTM Aqueous Mounting Medium (日本ターナー社、東京)で封入し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(3) リコンビナントTCTP p21 (rTCTP p21) の作製

既に報告した方法(ジャーナル・オブ・イミュノロジー (J. Immunol.)、第161巻、6356)に基づき、ヒトTCTP p21 cDNAをグルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合蛋白質発現ベクターに組み込み大腸菌に発現させた。融

合蛋白質はトロンビン (40 unit) で処理してグルタチオン-S-トランスフェラーゼを解離させ、rTCTP p 21をイオン交換クロマトグラフィーで精製した。

(4) 脾組織、細胞、培養液および血清中のTCTP p 21の測定

抽出した脾および肝組織は、2 mM EDTA、2 mM EGTA、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) および0.1 mM leupeptin を含む pH7.4 の 100 mM Tris-HCl バッファーを加えて、テフロンのパッターでホモジネートした。得られたホモジネートを 10500 g、4℃、15 分間で遠心して、可溶性蛋白質を調製した。35 mm 径培養ディッシュで培養したMIN 6細胞に、2 mM EDTA、2 mM EGTA、1 mM PMSF および0.1 mM leupeptin を含む pH7.4 の 100 mM Tris-HCl バッファーを加えてラバーポリスマンで細胞を剥離し、さらに細胞をテフロンのパッターでホモジネートした。得られたホモジネートを 10500 g、4℃、15 分間で遠心して、可溶性蛋白質を調製した。メディウムは 1.5 ml のマイクロチューブに回収し、900 g で 5 分間遠心した。上清を遠心濃縮チューブ (10,000 NMWL filter tube ; ミリポア社、Bedford、MA) を用いて 50 倍濃縮した。マウスの心臓と尾静脈より採血した血液は、抗凝固剤入りのBDチューブに入れて 5000 rpm で遠心し、血小板を含まない血清を得た。

抽出した蛋白質 (50 μ g)、血清 4 μ l、50 倍に濃縮した培養液 (20 μ l) を 12% SDS-PAGE で分離し、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に転写した。転写後、PVDF膜を 4% 精製ミルクカゼインで 1 時間、室温でブロッキングし、0.05% Tween 20 を含む PBS (PBS-T) で洗浄した。次に PVDF膜を 1 次抗体 (3,000 倍希釈した抗TCTP p 21抗体) と室温で 1 時間反応させた。PBS-T で洗浄後、2 次抗体 [6,000 倍希釈した horse radish peroxidase 標識抗ウサギ IgG F(ab')₂] (日本アマシャム社、東京) と室温で 1 時間反応させた。PBS-T で PVDF膜を洗浄後、結合した 1 次抗体は ECL 検出キット (日本アマシャム社、東京) を用いて検出した。

(5) MIN 6 細胞および単離脾ランゲルハンス島からのインスリン分泌の測定

MIN 6 細胞は 15% FCS を含む高グルコース含有 DMEM 中で 24 穴およ

び96穴プレートにて4日間培養後、実験に用いた。2.8 mM グルコースおよび15% FCSを含むDMEMに交換して1.5時間インキュベーションした後、25 mM グルコースと15% FCSを含むDMEMに交換してグルコース刺激を種々の時間おこなった。

異なった濃度の rTCTP p 2.1 を種々の時間添加した細胞も同様のグルコース刺激を行ない、培養液中に分泌されたインスリン量をインスリン測定 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) キット (レビス インスリンキッド、シバヤギ、群馬) を用いて測定した。細胞は1 N NaOHで溶解し、蛋白質定量に用いた。

単離膵ランゲルハンス島は5個ずつ、2.8 mM グルコースと15% FCSを含むDMEMに入れ、異なった濃度の rTCTP p 2.1 を種々の時間加えた後、同様のグルコース刺激を行ない、培養液中に放出されたインスリン量を上記と同様の方法測定した。インキュベーションはすべて37℃、5% CO₂-95% air で行なった。

(6) 膵β細胞におけるTCTP p 2.1蛋白質の発現

マウス、ラットおよびモルモットの各組織でのTCTP p 2.1蛋白質の発現を抗TCTP p 2.1抗体を用いたウエスタンブロット法で調べた(図1)。動物種によって各組織での発現レベルは異なっていたが、膵臓では高レベルのTCTP p 2.1蛋白質の発現が共通して認められた。26kDaのTCTP p 2.1蛋白質より分子量の大きい約30kDaの蛋白質はN-glycosylationを受けたTCTP p 2.1である。マウス膵臓組織でのTCTP p 2.1およびインスリンの発現を蛍光抗体二重免疫組織染色により確認した。TCTP p 2.1は膵臓のランゲルハンス島のインスリン分泌細胞(β細胞)に発現していた(図2)。また、ヒト膵癌切除標本の正常組織部分を抗TCTP抗体を用いて免疫組織染色を行なった結果でも、TCTPはランゲルハンス島のβ細胞に発現していることを確認した。

(7) グルコース刺激による膵β細胞でのTCTP p 2.1の誘導

マウス膵β細胞(MIN6細胞)を低グルコース(2.8 mM)のDMEM中で、1.5時間インキュベーションした後、高グルコース(25 mM)のDMEMに交換し、経時的にTCTP p 2.1蛋白質量の変化をウエスタンブロット法により

調べた (図 3 A)。高グルコース刺激前の T C T P p 2 1 レベルを 1 とした場合、グルコース刺激により M I N 6 細胞内に誘導された T C T P p 2 1 レベルのデンシトメーター値を以下に示す。

〔表 1〕

グルコース刺激前	3 0 分後	1 時間後	2 時間後	4 時間後	8 時間後
1. 0 0	1. 6 4	1. 6 6	2. 0 0	2. 1 6	3. 2 4

同時に、培養液中に分泌された T C T P p 2 1 量を調べたところ、刺激後 1 時間までは検出されなかったが、刺激後 1 時間から 4 時間の間に低レベルの T C T P p 2 1 が検出された (図 3 B)。

(8) インスリンによる M I N 6 細胞内の T C T P p 2 1 発現レベルの抑制と分泌作用

高グルコース下および低グルコース下で 1 0 n M のインスリンを M I N 6 細胞に添加し、細胞内の T C T P p 2 1 蛋白質量の変化をウェスタンブロット法により経時的に調べた (図 4 A、B)。インスリン刺激前の T C T P p 2 1 レベルを 1 とした場合、インスリン刺激後の M I N 6 細胞内における T C T P p 2 1 レベルのデンシトメーター値を以下に示す。

〔表 2〕

高グルコース下 (2 5 m M)					
インスリン刺激前	3 0 分後	1 時間後	2 時間後	4 時間後	8 時間後
1. 0 0	0. 8 2	0. 6 8	0. 5 4	0. 6 2	0. 7 4

〔表 3〕

低グルコース下 (2. 8 m M)					
インスリン刺激前	3 0 分後	1 時間後	2 時間後	4 時間後	8 時間後
1. 0 0	0. 5 4	0. 3 6	0. 2 8	0. 2 1	0. 0 7

同時に、培養液中に分泌された T C T P p 2 1 量を調べたところ、高グルコー

ス下では検出範囲内のTCTP p 2 1の分泌は認められなかったが、低グルコース下では、細胞内の減少量に相当するTCTP p 2 1の分泌を確認した(図4C)。

(9) rTCTP p 2 1によるMIN 6細胞のインスリン分泌の抑制

0.01~2 μ g/ml の rTCTP p 2 1で8時間インキュベーションしたMIN 6細胞を、低グルコース下(2.8 mM)で1.5時間インキュベーションし、高グルコース(25 mM)の培養液に交換し、グルコース刺激を1時間行ない分泌されたインスリンを測定した。尚、低グルコース下で1時間に分泌されるインスリン量を基礎分泌量とした。また、この間 rTCTP p 2 1は常に反応液中に添加しておいた。分泌されたインスリン量を以下に示す。

[表4]

条件	インスリン分泌量 (ng/ μ g protein/h)		
	平均	標準偏差	n
低グルコース (2.8 mM)	0.160	0.022	4
高グルコース (25 mM)			
— rTCTP p21	0.695	0.101	4
+0.01 μ g/ml rTCTP p21	0.477	0.021	4
+0.1 μ g/ml rTCTP p21	0.334	0.089	5
+0.5 μ g/ml rTCTP p21	0.215	0.011	5
+1 μ g/ml rTCTP p21	0.211	0.043	5
+2 μ g/ml rTCTP p21	0.239	0.070	5

次に、1 μ g/ml rTCTP p 2 1をグルコース刺激前3.5、5.5、9.5、および13.5時間に添加した場合の1時間のインスリン分泌量を示す。

〔表 5〕

条件	インスリン分泌量 (ng/μg protein/h)		
	平均	標準偏差	n
低グルコース (2.8 mM)	0.160	0.022	4
高グルコース (25 mM)			
- rTCTP p21	0.695	0.101	4
+ 1 μg/ml rTCTP p21, 3.5hours	0.247	0.047	5
+ 1 μg/ml rTCTP p21, 5.5hours	0.261	0.038	4
+ 1 μg/ml rTCTP p21, 9.5hours	0.211	0.043	5
+ 1 μg/ml rTCTP p21, 13.5hours	0.333	0.125	5

さらに、1 μg/ml の rTCTP p21 で 8 時間処理した MIN 6 細胞を低グルコース下で 1.5 時間インキュベーションし、グルコース刺激した細胞からの経時的なインスリンの分泌を測定して無処理の細胞と比較したデータを示す。

〔表 6〕

刺激時間	グルコース刺激後のインスリン分泌量 (ng/μg protein/h)	
	無処理の細胞	rTCTP p21 処理細胞
2 分	0.223	0.117
5 分	0.719	0.121
10 分	0.989	0.122
20 分	1.058	0.185
30 分	1.241	0.255

大腸菌より作成したリコンビナント TCTP p21 蛋白質 (rTCTP p21) には、大腸菌由来のエンドトキシン (LPS) が微量混入している (1 μg/ml の rTCTP p21 反応液には約 10 ng/ml の LPS が含まれている)。rTCTP p21 の作用が混入している LPS によるものでないことを確かめるため、MIN 6 細胞に大腸菌 K-235 株の LPS (シグマ社) を種々の濃度加え 8 時間作用させた。この細胞からのインスリン分泌を示す。

〔表 7〕

条件	インスリン分泌量 (ng/ μ g protein/h)		
	値 1	値 2	平均
- L P S	0.427	0.324	0.376
+ L P S (0.01 μ g/ml)	0.446	0.518	0.482
+ L P S (0.1 μ g/ml)	0.618	0.626	0.622
+ L P S (1 μ g/ml)	0.445	0.469	0.457
+ L P S (10 μ g/ml)	0.408	0.343	0.376

また、200ng/ml のポリミキシンBで 25℃、60 分間 rTCTP p 2 1 の処理をおこなっても rTCTP p 2 1 のグルコース刺激によるインスリン分泌抑制作用は消失しなかった。

(10) rTCTP p 2 1 によるマウス単離膵ランゲルハンス島からのインスリン分泌の抑制

(10-1)

C3H/HeNマウスから膵ランゲルハンス島を分離し、高グルコースのDMEM中で、0.01~1 μ g/ml の rTCTP p 2 1 を中等度のサイズのランゲルハンス島 5 個に添加して 8 時間作用させた後、低グルコース (2.8 mM) で 1.5 時間インキュベーションした。このランゲルハンス島を高グルコース (25 mM) の培養液に交換し、グルコース刺激を 1 時間行なった。尚、低グルコース下で 1 時間に分泌されるインスリン量を基礎分泌量とした。また、この間 rTCTP p 2 1 は常に反応液中に添加しておいた。分泌されたインスリン量を以下に示す。

〔表 8〕

条件	インスリン分泌量 (ng/5 islets/h)		
	平均	標準偏差	n
低グルコース (2.8 mM)	0.50	0.14	5
高グルコース (25 mM)			
－ rTCTP p21	16.35	2.75	8
+0.01 μ g/ml rTCTP p21	16.10	3.67	4
+0.1 μ g/ml rTCTP p21	14.55	0.75	6
+0.5 μ g/ml rTCTP p21	9.66	1.44	4
+1 μ g/ml rTCTP p21	2.02	0.50	6

C57BL/6マウスからも膵ランゲルハンス島を分離して、rTCTP p21の作用を確認した。分離した中等度のサイズのランゲルハンス島 5 個を 1 μ g/ml の rTCTP p21 で種々の時間処理した後、グルコース刺激を行ない 1 時間あたりのインスリン分泌量を測定した。

〔表 9〕

1 μ g/ml rTCTP p21 処理時間	インスリン分泌量 (ng/5 islets/h)		
	平均	標準偏差	n
低グルコース (2.8 mM)	0.34	0.06	6
高グルコース (25 mM)			
－ rTCTP p21	3.85	0.63	7
同時投与	1.50	0.18	3
0.5 時間	0.58	0.17	3
1.5 時間	0.91	0.28	3
3.5 時間	0.96	0.14	3
9.5 時間	0.66	0.22	6

(10-2)

SDラットから膵ランゲルハンス島を分離し、高グルコースのDMEM中で、

0.5~2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の rTCTP p21 を中等度のサイズのランゲルハンス島約 5 個に添加して 3 時間作用させた後、低グルコース (2.8 mM) で 1 時間インキュベーションした。このランゲルハンス島を高グルコース (25 mM) の培養液に交換し、グルコース刺激を 1 時間行なった。尚、低グルコース下で 1 時間に分泌されるインスリン量を基礎分泌量とした。また、この間 rTCTP p21 は常に反応液中に添加しておいた。分泌されたインスリン量を以下に示す。

〔表 10〕

条件	インスリン分泌量 ($\mu\text{U}/\mu\text{gDNA}/\text{h}$)		
	平均	標準偏差	n
低グルコース (2.8 mM)	1270	429	4
高グルコース (25 mM)			
— rTCTP p21	1777	176	4
+ 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ rTCTP p21	1612	135	4
+ 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ rTCTP p21	1228	115	4
+ 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ rTCTP p21	1371	126	4

(10-3)

rTCTP p21 によるインスリン分泌阻害作用が細胞傷害によるものでないこと、また、この阻害が可逆的であることを確認するために、以下の実験を行なった。まず、C57BL/6 マウスから分離した中間サイズの膵ランゲルハンス島 5 個を 1.5 時間 2.8 mM グルコースを含む DMEM でインキュベーションした。

1 時間インキュベーション経過した時点で、1 mg/ml の rTCTP p21 を添加し、30 分後に同じく 1 mg/ml の rTCTP p21 の存在下で 25 mM のグルコースを含む DMEM でランゲルハンス島を 1 時間刺激した (表 11 の①)。その後、ランゲルハンス島を DMEM で洗浄して rTCTP p21 を除き、再び 2.8 mM グルコースを含む DMEM で 30 分間インキュベーションした後 (表 11 の②)、25 mM のグルコースを含む DMEM でランゲルハンス島を 1 時間刺激し (表 11 の③)、この間の各インキュベーション中に分泌されたインスリン量を測定した。実験は 3 回行なった。

〔表 1 1〕

インスリン分泌量(ng/h/5 islets)		
	平均値	標準偏差
rTCTP p21(－)		
①	2.54	0.28
②	0.64	0.11
③	3.00	0.32
rTCTP p21(+)		
①	0.73	0.14
②	0.63	0.14
③	2.28	0.33

表中、rTCTP p21(－)はコントロール群を示す。

(11) 食餌摂取によるマウス膵臓でのTCTP p21の誘導

24 時間絶食させたC3H/HeNマウスに固形食を与え、経時的に膵臓のTCTP p21レベルをウエスタンブロット法で測定し、摂食開始前のTCTP p21レベルを1として、摂食後の膵臓でのTCTP p21レベルのデシントメーター値を以下に示す(図5参照)。

〔表 1 2〕

	摂食前	0.5時間	1時間	2時間	4時間	8時間
1回目	1.00	1.98	0.63	6.36	9.75	
2回目	1.00	0.75	1.06	4.67	3.22	0.73

C57BL/6マウスに、毎日、2時間(8:00～10:00)、7日間固形食を与え、8日目の食餌直前、開始後1, 2, 4, 8および12時間後に屠殺して末梢血を採血し、肝臓および膵臓を摘出した。血漿中(血小板を除いた分画)と肝臓および膵臓中のTCTP p21量をウエスタンブロット法で測定し、摂食開始前のそれぞれのTCTP p21レベルを1として、摂食後のTCTP p21レベルのデシントメーター値を以下に示す。データは2匹の平均値で示し

た (図 6 参照)。

〔表 1 3〕

	摂食前	1 時間	2 時間	4 時間	8 時間	12時間
肝臓	1.00	1.01	1.44	1.23	0.90	0.94
膵臓	1.00	2.32	2.83	2.78	3.51	1.68
血漿	1.00	5.60	2.74	4.00	0.62	1.47

実験例 2 抗 rTCTP p 2 1 中和抗体によるインスリン分泌促進効果

(1) 精製中和抗体の濃度依存性効果

rTCTP p 2 1 でウサギを免疫して抗 rTCTP p 2 1 抗体を作成した。得られた抗血清をアフィニティー精製して抗体 A を作成した。C 5 7 B L / 6 マウスから分離した膵ランゲルハンス島を用いて抗体の中和活性を測定した。中間サイズのランゲルハンス島 5 個を 1.5 時間 2.8 mM グルコースを含む DMEM でインキュベーションした後、25 mM のグルコースを含む DMEM で 1 時間刺激して放出されたインスリン量を測定した。1 μ g/ml の rTCTP p 2 1 は、1.5 時間 2.8 mM グルコースを含む DMEM でインキュベーション開始直後に添加し、高グルコース刺激の間も継続して存在させた。抗体処理は rTCTP p 2 1 と抗体 A を室温で 30 分間反応させたものを添加した。結果を表 1 4 に示す。

〔表 1 4〕

条件	インスリン分泌量 (ng/h/5 islets)		
		平均値	標準偏差
2.8mM グルコース	0.43		
25mM グルコース	2.60, 2.48, 2.75	2.61	0.11
rTCTP p21 (1 μ g/ml)	0.93, 0.88, 1.05	0.95	0.07
rTCTP p21 (1 μ g/ml)	1.40, 0.94, 1.25	1.19	0.19
+精製抗体A (0.001 μ g/ml)			
rTCTP p21 (1 μ g/ml)	2.00, 1.68, 2.47, 1.40	1.18	0.40
+精製抗体A (0.01 μ g/ml)			
rTCTP p21 (1 μ g/ml)	4.30, 3.60, 5.40, 3.40	4.18	0.78
+精製抗体A (0.1 μ g/ml)			
rTCTP p21 (1 μ g/ml)	4.85, 3.05, 3.65	3.85	0.75
+精製抗体A (1 μ g/ml)			

(2) 精製中和抗体による内因性 r T C T P p 2 1 抑制効果

C 5 7 B L / 6 マウスから分離した膵ランゲルハンス島を用いて、内因性 T C T P p 2 1 に対する抗体 A の中和活性を測定した。中間サイズのランゲルハンス島 5 個を 1.5 時間 2.8 mM グルコースを含む DMEM でインキュベーションした後、25 mM のグルコースを含む DMEM で 1 時間刺激して放出されたインスリン量を測定した。コントロールとして正常ウサギ I g G 1 μ g/ml を用いた。結果を表 1 5 に示す。

[表 1 5]

条件	インスリン分泌量 (ng/h/5 islets)	
	平均値	標準偏差
2.8mM グルコース	0.38, 0.50, 0.24, 0.43, 0.53, 0.32	0.40 0.10
25mM グルコース	3.58, 3.13, 3.63, 3.60, 3.65, 2.80, 3.25, 2.90, 3.72, 3.15, 2.70, 2.75, 3.25	3.24 0.36
精製抗体A (1 μ g/ml)	3.60, 4.70, 4.75, 4.30, 3.60, 5.40, 3.40, 4.33, 3.60 4.40	4.59 0.78
Normal IgG (1 μ g/ml)	3.60, 3.65, 2.80, 2.91	3.24 0.39

表中、Normal IgG は、正常ウサギ I g G を示す。

実験例 3

(1) グルコース刺激による MIN6 細胞からの TCTP p 2 1 誘導

マウス膵 β 細胞株 (MIN6 細胞) を非動化済み牛胎児血清 15% (FCS、フロー社、McLean, VA)、100 IU/ml ペニシリン、100 mg/ml ストレプトマイシン、5 μ M 2-メルカプトエタノールおよび 25 mM グルコースを含む DMEM を用いて 37°C、5% CO₂-95% air にて培養した。なお、実験には 18-23 継代の細胞を用いた。この MIN6 細胞を 2.5, 5, 10, 及び 25 mM のグルコース濃度で 4 時間培養し、抗 TCTP p 2 1 抗体を用いたウエスタンブロット法で細胞内の TCTP p 2 1 レベルを測定した。その結果、MIN6 細胞は培養液中のグルコース濃度に比例して、TCTP p 2 1 を誘導した (図 7)

(2) グルコース刺激及び摂食による膵組織からの TCTP p 2 1 誘導

(2-1)

一晚絶食させた C57BL/6 雄性マウス(12-16 週齢)に経口ゾンデを用いて 3g/kg 体重のグルコースを胃内投与し、経時的に膵臓及び血清を採取して TCTP p 21 量をウエスタンブロット法で測定した(図 8)。また、固形食を与えたマウスでも同様の測定を行なった(図 9)。その結果、MIN6 細胞で認められたと同様に、マウスにグルコースを経口投与すると、膵組織では 30 分以内に 1~2 時間をピークとする一過性の TCTP p 21 の誘導が認められ、これに一致して血中の TCTP p 21 レベルも上昇した。また、グルコースを単独投与するより摂食を行なわせた方がより強い膵組織および血中の TCTP p 21 レベルの上昇を引き起こした。

(2-2)

一晚絶食させた C57BL/6 雄性マウス(12-16 週齢)に TCTP p 21 の中和抗体(抗体 A)あるいは正常ウサギ IgG を 0.8 mg の腹腔内投与した。2 時間後に 2 g/kg 体重のグルコースを腹腔内投与して血漿中のインスリン量を ELISA 法で測定した。その結果、中和抗体を投与すると、グルコース投与後 30、60、120 分のインスリン分泌量が有意に高値を示した(図 10)。図 10 において、○は正常ウサギ IgG を、■は中和抗体を投与した時の結果を示す。

(2-3)

一晚絶食させた C57BL/6 マウスの尾静脈に r TCTP p 21 30 μ g を含む生理食塩水 50 μ l あるいは生理食塩水(ビークル) 50 μ l を投与し、直後に、2 g/kg 体重のグルコースを腹腔内投与して 30 分後のインスリン及び血糖値を測定した。その結果、r TCTP p 21 はグルコース投与によるインスリン分泌を有意に抑制し、血糖値を有意に上昇させた(図 11)。

(3) r TCTP p 21 によるインスリン分泌阻害作用

2.8 mM グルコースおよび 15%FCS を含む DMEM で MIN6 細胞を 1.5 時間インキュベーションした後、25 mM グルコースと 15%FCS を含む DMEM に交換して高グルコース刺激を行なった。高グルコース刺激 30 分前に 1 μ g の r TCTP p 21 または同量の生理食塩水(ビークル)を添加した。グルコース刺激後、1 及び 2 時間後に細胞から総 RNA を抽出して、RT-PCR 法により β アクチンとプロイン

スリンの mRNA 量を測定した。同様にグルコース刺激前と刺激 1 時間後に細胞蛋白質を抽出し、細胞内のインスリン含量をウエスタンブロット法で測定した。その結果、r T C T P p 2 1 はグルコース刺激による MIN6 細胞からのインスリン分泌を阻害したが、r T C T P p 2 1 はインスリンの mRNA の発現には変化を及ぼさず (図 1 2)、細胞内のインスリン含量に変化を与えないことから (図 1 3)、インスリン分泌過程を阻害すると考えられた。値は mean \pm SD, n=4。

(4) T C T P p 2 1 過剰発現によるインスリン分泌阻害

ヒト T C T P p 2 1 cDNA を組み込んだ pcDNA3.1 発現プラスミドベクターまたは pcDNA3.1 発現プラスミドベクター単独を陽イオン性リポソーム (lipofectoAMINE) 法で MIN6 細胞に導入し T C T P p 2 1 を過剰発現させた。ベクターのみを導入した細胞と T C T P p 2 1 を過剰発現させた細胞に高グルコース刺激を行ない、60 分間で分泌されたインスリン量を測定した。その結果、ベクターのみを導入した細胞 (図 1 4 のベクター) と T C T P p 2 1 を過剰発現させた細胞 (図 1 4 の T C T P) の T C T P p 2 1 含量をウエスタンブロット法で確認し、それらの細胞のインスリン分泌能を比較すると、T C T P p 2 1 を過剰発現した細胞ではインスリン分泌能が消失した (図 1 4)。値は mean \pm SD, n=6。

(5) 空腹時の T C T P p 2 1 レベル測定

16 週齢の雄性 C57BL/6 マウスに 10%グルコース水を 2 及び 4 週間飲水させ、水道水を 4 週間飲水させたマウスとともに一晩絶食させ、マウスの尾静脈から採血し、血清中の T C T P p 2 1 レベルをウエスタンブロット法で測定した。その結果、慢性のグルコース負荷により体重がコントロールマウスのそれよりも 10-15%増加したマウスでは空腹時の T C T P p 2 1 レベルが上昇した (図 1 5)。

(6) T C T P p 2 1 中和抗体によるインスリンおよび血糖レベルの測定

10%グルコース水を 4 週間飲水させた雄性 C57BL/6 マウスを夜間摂食させた後、午前 8:00 から絶食を開始し 10%グルコース水も水道水に換えた。中和抗体 (総 IgG 量で 0.8 mg) または正常ウサギ IgG (0.8 mg) を絶食開始後 1、4、7 時間目にそれぞれ腹腔内投与した。絶食開始前及び開始後 4、10 時間目の血中インスリン値と血糖値を測定した。絶食開始後の各個体のそれぞれの値を 100%とし、

その後の変化を示した。値は mean \pm SEM で示した。コントロール IgG 投与群 6 匹、中和抗体投与群 10 匹。その結果、慢性にグルコース負荷を行なったマウスに TCTP p 21 中和抗体を投与すると空腹時インスリンが有意に増加し（図 16）、空腹時血糖も有意に低下した（図 17）。図 16 および図 17 において、□は正常ウサギ IgG を、■は中和抗体を投与した時の結果を示す。

（7）空腹時の GK ラット血清中 TCTP p 21 量の測定

GK (Goto-Kakizaki) ラットとコントロールラットの 3 週齢の空腹時血清を採取し、抗 TCTP p 21 抗体を用いてウエスタンブロット法で血清中の TCTP p 21 を測定した。GK ラットは、Wistar 系ラット (Jcl:Wistar ラット) に経口糖負荷試験 (OGTT) を行ない、耐糖能の低いラットを選抜し、交配を重ねることによって確立された自然発症糖尿病モデルラットである (Goto, Y. et al., Spontaneous produced by selective breeding of normal Wistar rats. Proc. Jap. Acad. Ser. B51: 80-85, 1975)。GK ラットでは 3 週齢よりすでに 30 kDa の TCTP p 21 量が増加していた。3、12、20 週齢の GK ラットとコントロールラットそれぞれ 4 匹ずつ同様の方法で血清中の TCTP p 21 を測定し、デンストメーター値で比較すると、GK ラットはコントロールラットに比べ、空腹時の TCTP p 21 量が、3 週齢では 3.6 ± 0.5 倍 (mean \pm SD, n=4)、12 週齢では 2.2 ± 0.5 倍 (n=4)、20 週齢では 2.3 ± 0.4 倍 (n=4) それぞれ増加していた。

産業上の利用可能性

IgE 依存性 HR F の作用を阻害する物質はインスリン分泌促進剤、糖尿病予防・治療剤などとして、IgE 依存性 HR F またはその作用を有する物質はインスリン分泌阻害剤などとして有用である。

本出願は、日本で出願された特願 2000-280153 を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

請求の範囲

1. I g E依存性ヒスタミン放出因子の作用を阻害する物質を含有してなるインスリン分泌促進剤。
2. I g E依存性ヒスタミン放出因子の作用を阻害する物質を含有してなる糖尿病の予防・治療剤。
3. I g E依存性ヒスタミン放出因子の作用を阻害する物質が① I g E依存性ヒスタミン放出因子の受容体アンタゴニスト、② I g E依存性ヒスタミン放出因子に対する抗体、③ I g E依存性ヒスタミン放出因子の発現抑制物質、④ I g E依存性ヒスタミン放出因子を分解する物質または⑤ I g E依存性ヒスタミン放出因子の分解を促進する物質である請求項1または2記載の剤。
4. I g E依存性ヒスタミン放出因子が腫瘍関連蛋白質である請求項1～3のいずれかに記載の剤。
5. I g E依存性ヒスタミン放出因子が腫瘍関連蛋白質 p 2 1、腫瘍関連蛋白質 p 2 3または腫瘍関連蛋白質 p 2 6である請求項1～3のいずれかに記載の剤。
6. インスリン分泌不全に起因する疾患の予防・治療剤である請求項1記載の剤。
7. 耐糖能障害、ケトーシス、アシドーシス、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、高脂血症、性機能障害、皮膚疾患、関節症または骨減少症の予防・治療剤である請求項1記載の剤。
8. 哺乳動物に対して、I g E依存性ヒスタミン放出因子の作用を阻害する物質の有効量を投与することを特徴とするインスリン分泌促進方法。
9. 哺乳動物に対して、I g E依存性ヒスタミン放出因子の作用を阻害する物質の有効量を投与することを特徴とするインスリン分泌不全に起因する疾患の予防・治療方法。
10. 哺乳動物に対して、I g E依存性ヒスタミン放出因子の作用を阻害する物質の有効量を投与することを特徴とする耐糖能障害、ケトーシス、アシドーシス、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、高脂血症、性機能障害、皮膚疾患、関節症または骨減少症の予防・治療方法。
11. 哺乳動物に対して、I g E依存性ヒスタミン放出因子の作用を阻害する

物質の有効量を投与することを特徴とする糖尿病の予防・治療方法。

12. インスリン分泌促進剤を製造するための I g E 依存性ヒスタミン放出因子の作用を阻害する物質の使用。

13. インスリン分泌不全に起因する疾患の予防・治療剤を製造するための I g E 依存性ヒスタミン放出因子の作用を阻害する物質の使用。

14. 耐糖能障害、ケトーシス、アシドーシス、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、高脂血症、性機能障害、皮膚疾患、関節症または骨減少症の予防・治療剤を製造するための I g E 依存性ヒスタミン放出因子の作用を阻害する物質の使用。

15. 糖尿病の予防・治療剤を製造するための I g E 依存性ヒスタミン放出因子の作用を阻害する物質の使用。

16. I g E 依存性ヒスタミン放出因子またはその作用を有する物質を含有してなるインスリン分泌阻害剤。

17. I g E 依存性ヒスタミン放出因子の作用を有する物質が① I g E 依存性ヒスタミン放出因子の受容体アゴニスト、② I g E 依存性ヒスタミン放出因子の作用を増強もしくは促進する物質、③ I g E 依存性ヒスタミン放出因子の発現促進物質または④ I g E 依存性ヒスタミン放出因子の分解を阻害する物質である請求項 16 記載の剤。

18. I g E 依存性ヒスタミン放出因子が腫瘍関連蛋白質である請求項 16 または 17 記載の剤。

19. I g E 依存性ヒスタミン放出因子が腫瘍関連蛋白質 p 21、腫瘍関連蛋白質 p 23 または腫瘍関連蛋白質 p 26 である請求項 16 または 17 記載の剤。

20. インスリン過剰分泌に起因する疾患の予防・治療剤である請求項 16 記載の剤。

21. 肥満、高脂血症、2 型糖尿病、低血糖症、高血圧、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、浮腫、インスリン抵抗性、不安定糖尿病、脂肪萎縮、インスリンアレルギーまたはインスリノーマの予防・治療剤である請求項 16 記載の剤。

22. 哺乳動物に対して、I g E 依存性ヒスタミン放出因子またはその作用を

有する物質の有効量を投与することを特徴とするインスリン過剰分泌に起因する疾患の予防・治療方法。

23. 哺乳動物に対して、I g E依存性ヒスタミン放出因子またはその作用を有する物質の有効量を投与することを特徴とする肥満、高脂血症、2型糖尿病、低血糖症、高血圧、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、浮腫、インスリン抵抗性、不安定糖尿病、脂肪萎縮、インスリンアレルギーまたはインスリンノーマの予防・治療方法。

24. インスリン過剰分泌に起因する疾患の予防・治療剤を製造するためのI g E依存性ヒスタミン放出因子またはその作用を有する物質の使用。

25. 肥満、高脂血症、2型糖尿病、低血糖症、高血圧、糖尿病神経障害、糖尿病腎症、糖尿病網膜症、浮腫、インスリン抵抗性、不安定糖尿病、脂肪萎縮、インスリンアレルギーまたはインスリンノーマの予防・治療剤を製造するためのI g E依存性ヒスタミン放出因子またはその作用を有する物質の使用。

26. I g E依存性ヒスタミン放出因子および（または）I g E依存性ヒスタミン放出因子受容体を用いることを特徴とするインスリン分泌調節物質のスクリーニング方法。

27. I g E依存性ヒスタミン放出因子をコードするDNAおよび（または）I g E依存性ヒスタミン放出因子受容体をコードするDNAを用いることを特徴とするインスリン分泌調節物質のスクリーニング方法。

28. I g E依存性ヒスタミン放出因子および（または）I g E依存性ヒスタミン放出因子受容体を含有することを特徴とするインスリン分泌調節物質のスクリーニング用キット。

29. I g E依存性ヒスタミン放出因子をコードするDNAおよび（または）I g E依存性ヒスタミン放出因子受容体をコードするDNAを含有することを特徴とするインスリン分泌調節物質のスクリーニング用キット。

30. 請求項26または27記載のスクリーニング方法または請求項28または29記載のスクリーニング用キットを用いて得られうるインスリン分泌調節物質。

31. 請求項26または27記載のスクリーニング方法または請求項28また

は29記載のスクリーニング用キットを用いて得られうるインスリン分泌調節物質を含有してなる医薬。

32. インスリン分泌調節剤である請求項31記載の医薬。

33. 糖尿病の予防・治療剤である請求項31記載の医薬。

34. 哺乳動物に対して、請求項26または27記載のスクリーニング方法または請求項28または29記載のスクリーニング用キットを用いて得られうるインスリン分泌調節物質の有効量を投与することを特徴とするインスリン分泌調節方法。

35. 哺乳動物に対して、請求項26または27記載のスクリーニング方法または請求項28または29記載のスクリーニング用キットを用いて得られうるインスリン分泌調節物質の有効量を投与することを特徴とする糖尿病の予防・治療方法。

36. IgE依存性ヒスタミン放出因子に対する抗体を含有することを特徴とするインスリン分泌異常の診断剤。

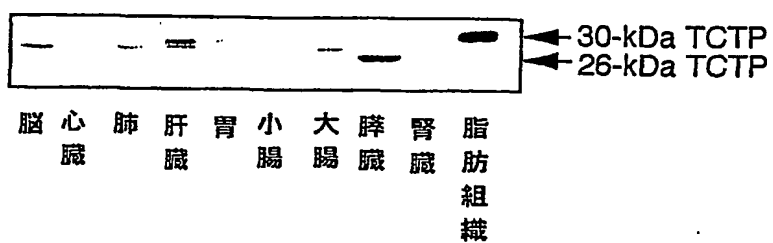
37. IgE依存性ヒスタミン放出因子に対する抗体を用いることを特徴とするインスリン分泌異常の診断方法。

38. IgE依存性ヒスタミン放出因子をコードするDNAを含有することを特徴とするインスリン分泌異常の診断剤。

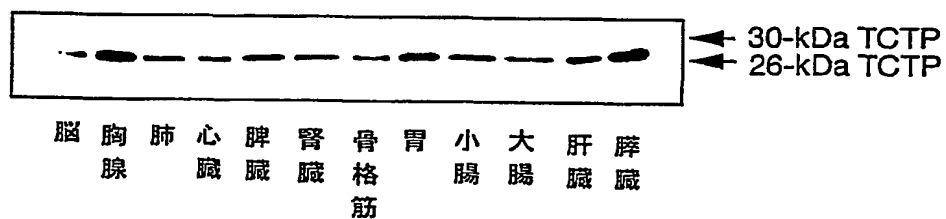
39. IgE依存性ヒスタミン放出因子をコードするDNAを用いることを特徴とするインスリン分泌異常の診断方法。

図 1

A. マウス



B. ラット



C. モルモット

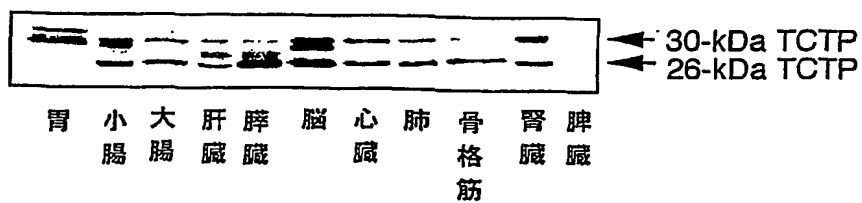


図 2

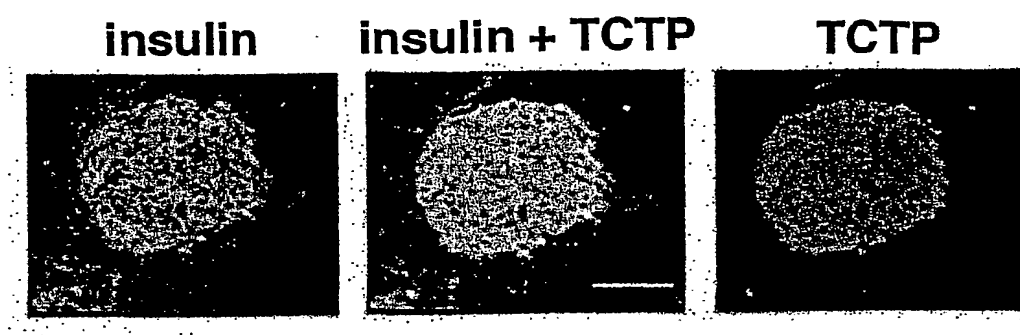
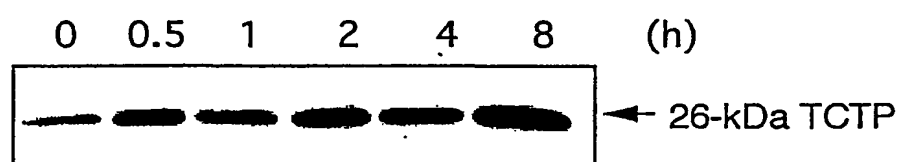


図 3

A. MIN6細胞内



B. 培養上清

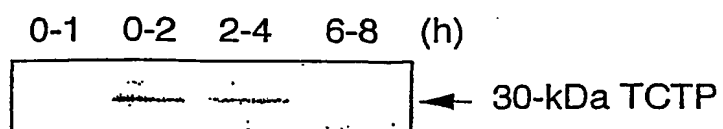
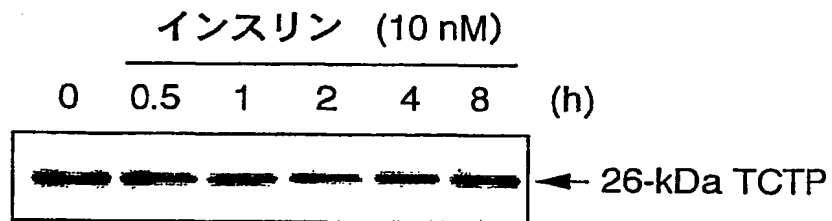
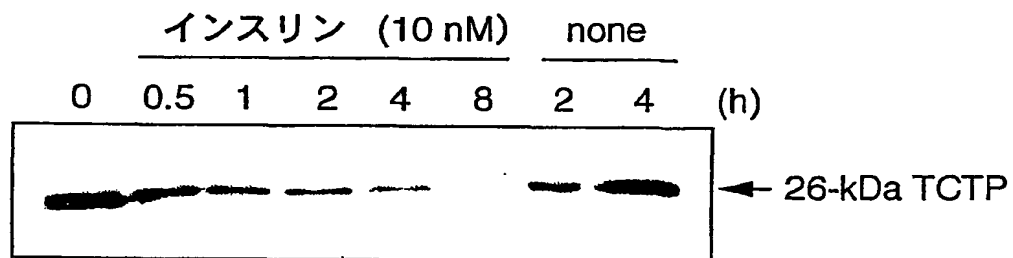


図 4

A. MIN6細胞内 (25 mM グルコース)



B. MIN6細胞内 (2.8 mM グルコース)



C. 培養上清 (2.8 mM グルコース)

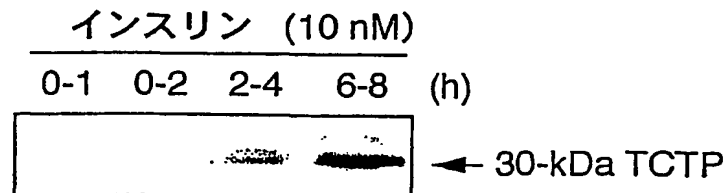


図 5

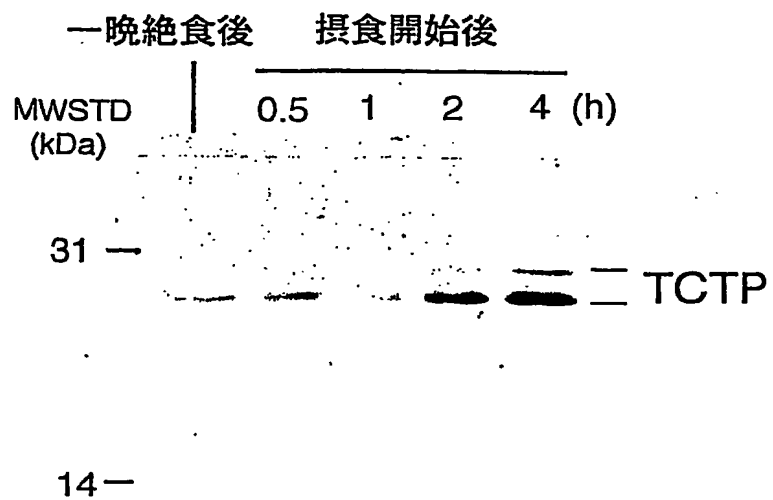
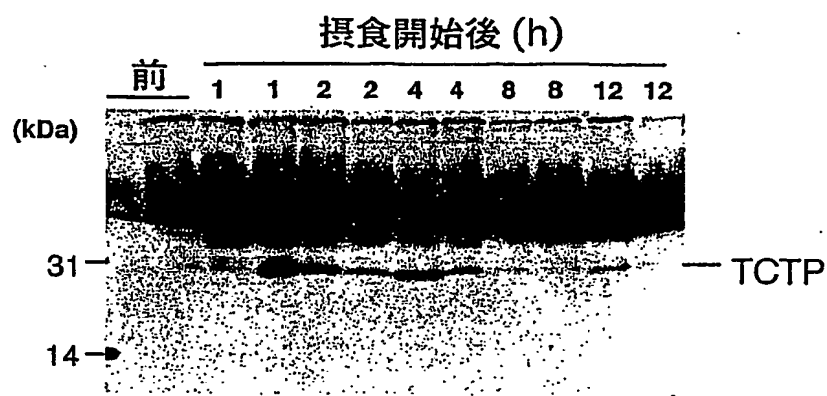
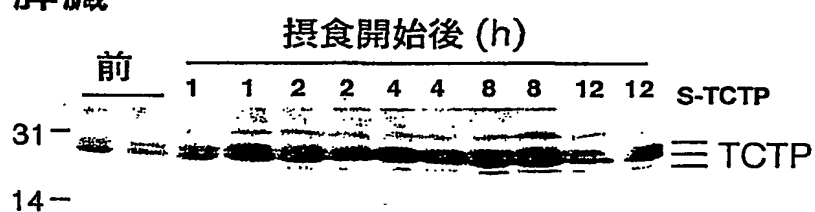


図 6

A. 血漿



B. 脾臓



C. 肝臓

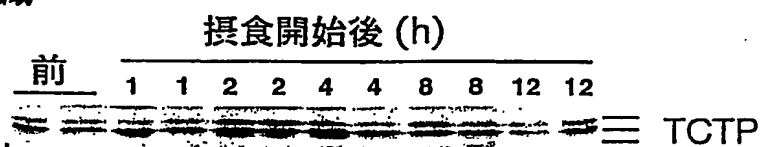


図 7

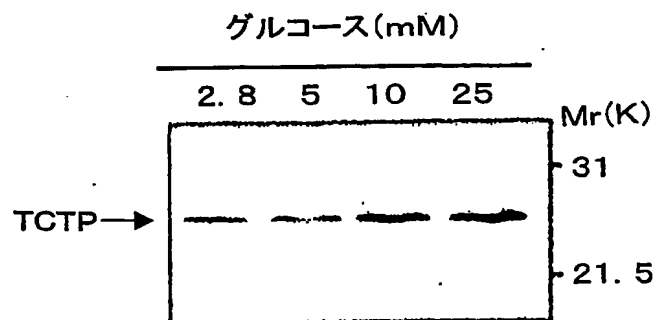


図 8

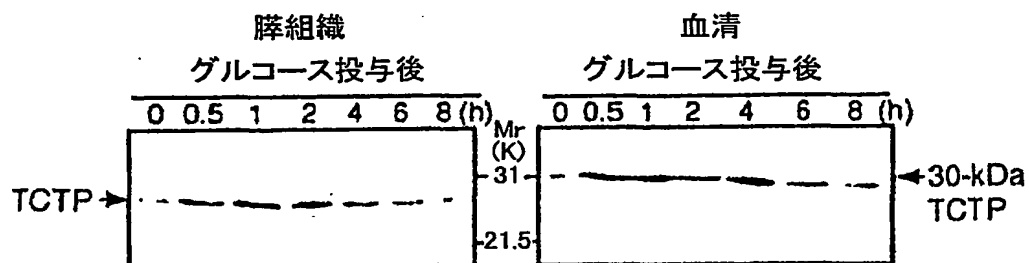


図 9

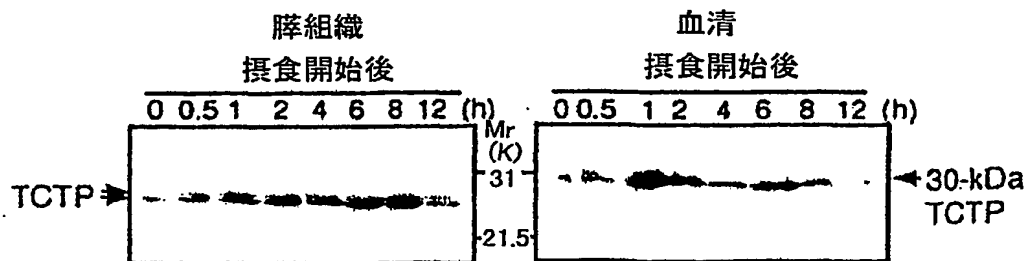


図 10

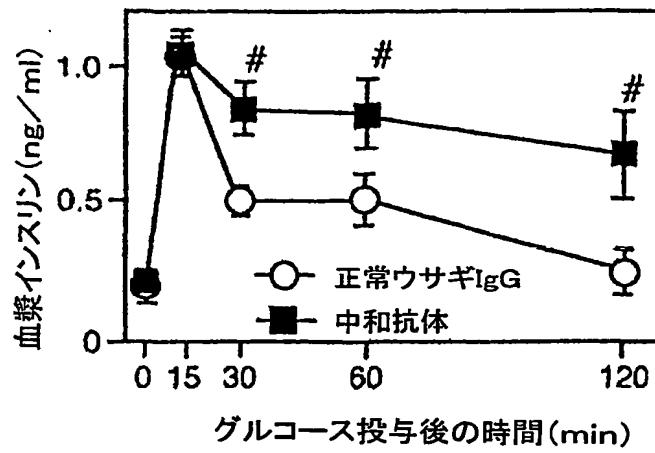


図 11

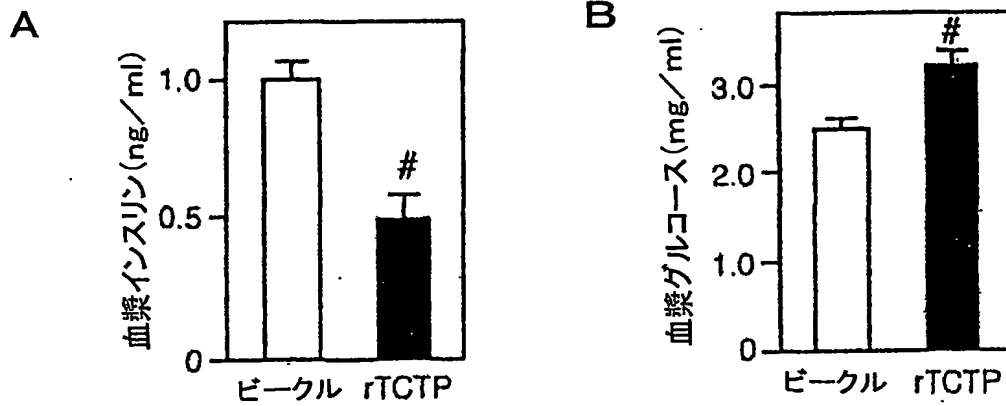


図 12

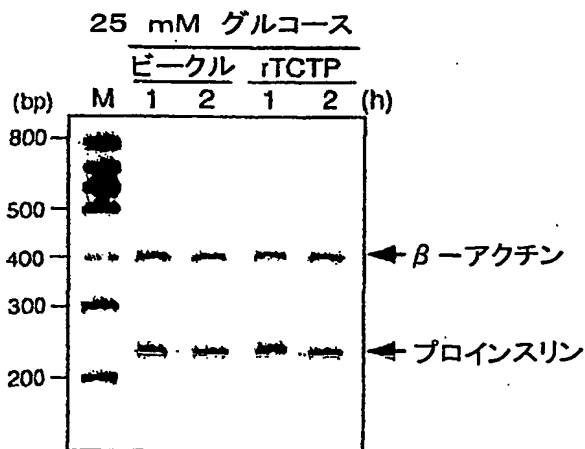


図 13

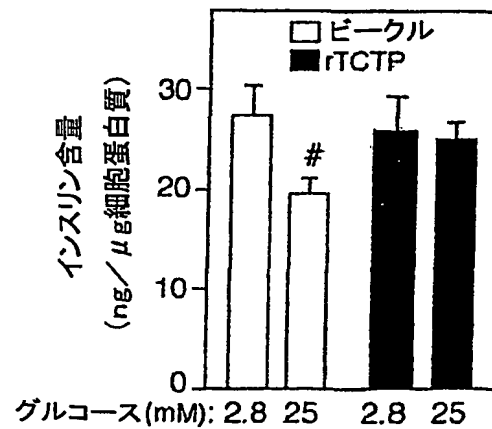


図 14

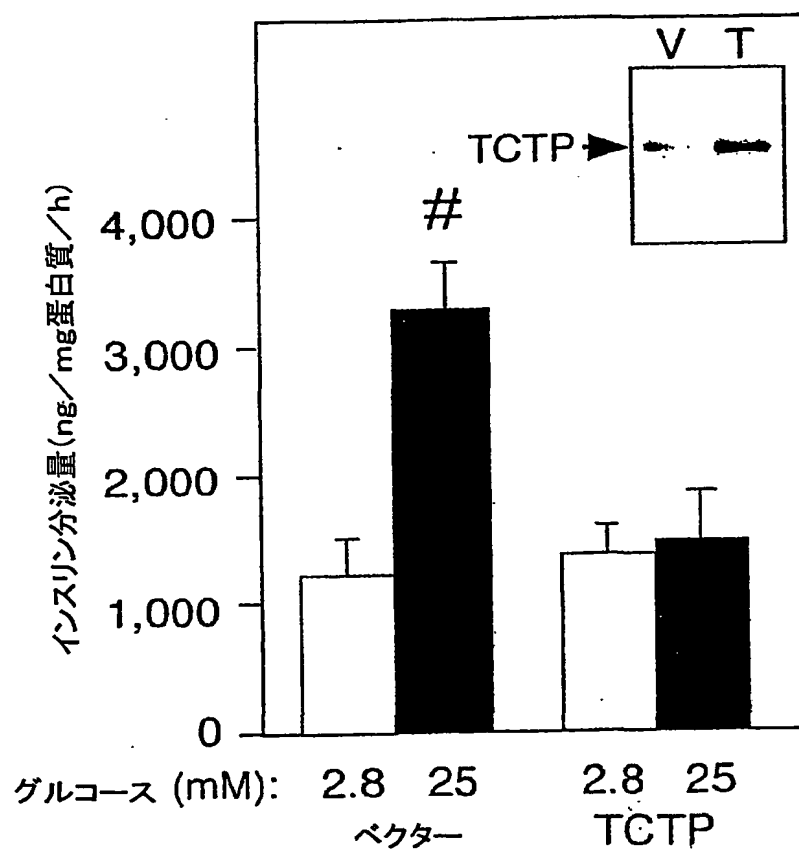


図 15

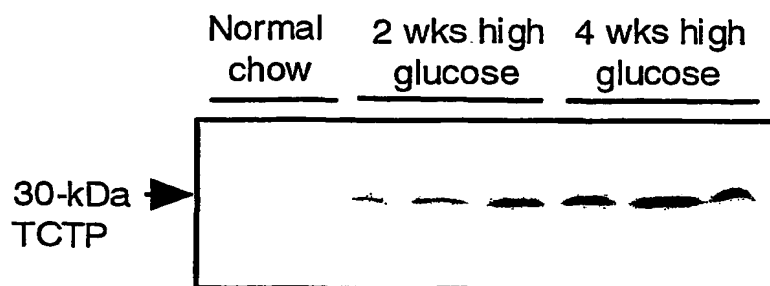


図 16

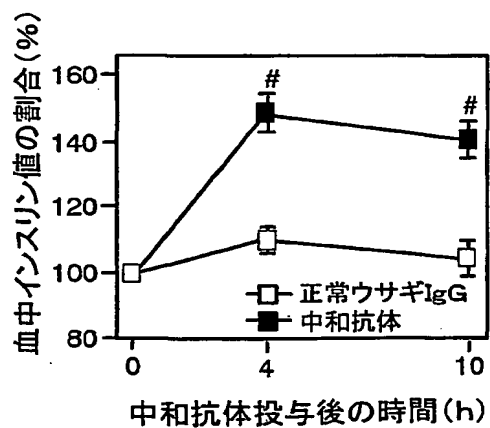
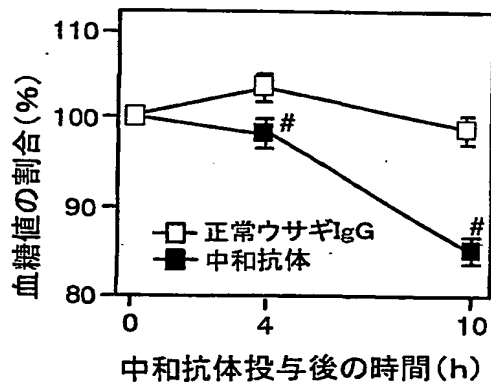


図 17



配列表

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> An Insulin Secretion Inhibitor

<130> 09415

<150> JP 2000-280153

<151> 2000-09-11

<160> 6

<210> 1

<211> 172

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 1

Met	Ile	Ile	Try	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	His	Asp	Glu	Leu	Phe	Ser	Asp
1				5				10					15		
Ile	Try	Lys	Ile	Arg	Glu	Ile	Ala	Asp	Gly	Leu	Cys	Leu	Glu	Val	Glu
				20				25					30		
Gly	Lys	Met	Val	Ser	Arg	Thr	Glu	Gly	Ala	Ile	Asp	Asp	Ser	Leu	Ile
				35				40					45		
Gly	Gly	Asn	Ala	Ser	Ala	Glu	Gly	Pro	Glu	Gly	Glu	Gly	Thr	Glu	Ser
				50				55					60		
Thr	Val	Val	Thr	Gly	Val	Asp	Ile	Val	Met	Asn	His	His	Leu	Gln	Glu
				65				70					75		80
Thr	Ser	Phe	Thr	Lys	Glu	Ala	Tyr	Lys	Lys	Tyr	Ile	Lys	Asp	Tyr	Met
				85				90					95		

Lys Ser Leu Lys Gly Lys Leu Glu Glu Gln Lys Pro Glu Arg Val Lys
 100 105 110
 Pro Phe Met Thr Gly Ala Ala Glu Gln Ile Lys His Ile Leu Ala Asn
 115 120 125
 Phe Asn Asn Tyr Gln Phe Phe Ile Gly Glu Asn Met Asn Pro Asp Gly
 130 135 140
 Met Val Ala Leu Leu Asp Tyr Arg Glu Asp Gly Val Thr Pro Phe Met
 145 150 155 160
 Ile Phe Phe Lys Asp Gly Leu Glu Met Glu Lys Cys
 165 170

<210> 2

<211> 172

<212> PRT

<213> Human

<400> 2

Met Ile Ile Try Arg Asp Leu Ile Ser His Asp Glu Met Phe Ser Asp
 1 5 10 15
 Ile Try Lys Ile Arg Glu Ile Ala Asp Gly Leu Cys Leu Glu Val Glu
 20 25 30
 Gly Lys Met Val Ser Arg Thr Glu Gly Asn Ile Asp Asp Ser Leu Ile
 35 40 45
 Gly Gly Asn Ala Ser Ala Glu Gly Pro Glu Gly Glu Gly Thr Glu Ser
 50 55 60
 Thr Val Ile Thr Gly Val Asp Ile Val Met Asn His His Leu Gln Glu
 65 70 75 80
 Thr Ser Phe Thr Lys Glu Ala Tyr Lys Lys Tyr Ile Lys Asp Tyr Met
 85 90 95
 Lys Ser Leu Lys Gly Lys Leu Glu Glu Gln Arg Pro Glu Arg Val Lys

100	105	110	
Pro Phe Met Thr Gly Ala Ala Glu Gln Ile Lys His Ile Leu Ala Asn			
115	120	125	
Phe Lys Asn Tyr Gln Phe Phe Ile Gly Glu Asn Met Asn Pro Asp Gly			
130	135	140	
Met Val Ala Leu Leu Asp Tyr Arg Glu Asp Gly Val Thr Pro Tyr Met			
145	150	155	160
Ile Phe Phe Lys Asp Gly Leu Glu Met Glu Lys Cys			
165	170		

<210> 3

<211> 172

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 3

Met Ile Ile Try Arg Asp Leu Ile Ser His Asp Glu Leu Phe Ser Asp			
1	5	10	15
Ile Try Lys Ile Arg Glu Ile Ala Asp Gly Leu Cys Leu Glu Val Glu			
20	25	30	
Gly Lys Met Val Ser Arg Thr Glu Gly Ala Ile Asp Asp Ser Leu Ile			
35	40	45	
Gly Gly Asn Ala Ser Ala Glu Gly Pro Glu Gly Glu Gly Thr Glu Ser			
50	55	60	
Thr Val Val Thr Gly Val Asp Ile Val Met Asn His His Leu Gln Glu			
65	70	75	80
Thr Ser Phe Thr Lys Glu Ala Tyr Lys Lys Tyr Ile Lys Asp Tyr Met			
85	90	95	
Lys Ser Leu Lys Gly Lys Leu Glu Glu Gln Lys Pro Glu Arg Val Lys			
100	105	110	

Pro Phe Met Thr Gly Ala Ala Glu Gln Ile Lys His Ile Leu Ala Asn
 115 120 125
 Phe Asn Asn Tyr Gln Phe Phe Ile Gly Glu Asn Met Asn Pro Asp Gly
 130 135 140
 Met Val Ala Leu Leu Asp Tyr Arg Glu Asp Gly Val Thr Pro Phe Met
 145 150 155 160
 Ile Phe Phe Lys Asp Gly Leu Glu Met Glu Lys Cys
 165 170

<210> 4

<211> 516

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 4

atgatcatct accgggacct catcagccat gacgagctgt tctccgacat ctacaagatc 60
 cgggagatcg cggacgggct gtgcctggag gtggagggca agatggtcag tagaacagag 120
 ggtgccatcg atgactcgct catcgggtgga aatgcttccg ctgaagggtcc ggagggcgaa 180
 ggtaccgaaa gcacagtagt caccgggtgtt gacattgtca tgaaccatca cttacaagaa 240
 accagcttca caaaagaggc ttacaaaaag tacatcaaag actacatgaa atcactcaaa 300
 ggcaaacttg aagagcagaa accagaaaga gtaaagcctt ttatgactgg agctgcagag 360
 cagattaagc acatccttgc taatttcaat aactaccagt tttttattgg tgaaaacatg 420
 aatccagatg gtatggttgc tctcctggac taccgtgaag atggtgtgac tccattcatg 480
 attttcttta aggatggctt agagatggag aaatgt 516

<210> 5

<211> 516

<212> DNA

<213> Human

<400> 5

```

atgattatct accgggacct catcagccac gatgagatgt tctccgacat ctacaagatc      60
cgggagatcg cggacggggt gtgcctggag gtggagggga agatggtcag taggacagaa     120
ggtaacattg atgactcgct cattggtgga aatgcctccg ctgaaggccc cgagggcgaa     180
ggtaccgaaa gcacagtaat cactggtgtc gatattgtca tgaaccatca cctgcaggaa     240
acaagtttca caaaagaagc ctacaagaag tacatcaaag attacatgaa atcaatcaaa     300
gggaaacttg aagaacagag accagaaaga gtaaaacctt ttatgacagg ggctgcagaa     360
caaatcaagc acatccttgc taatttcaaa aactaccagt tctttattgg tgaaaacatg     420
aatccagatg gcatggttgc tctattggac taccgtgagg atggtgtgac cccatatatg     480
attttcttta aggatggttt agaaatggaa aaatgt                                516

```

<210> 6

<211> 516

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 6

```

atgatcatct accgggacct catcagccat gacgagctgt tctccgacat ctacaagatc      60
cgggagatcg cggacgggct gtgcctggag gtggagggca agatggtcag tagaacagag     120
ggtgccatcg atgactcgct catcggtgga aatgcttccg ctgaagggtc ggagggcgaa     180
ggtaccgaaa gcacagtagt caccggtgtt gacattgtca tgaaccatca cttacaagaa     240
accagcttca caaaagaggc ttacaaaaag tacatcaaag actacatgaa atcactcaaa     300
ggcaaaacttg aagagcagaa accagaaaga gtaaagcctt ttatgactgg agctgcagag     360
cagattaagc acatccttgc taatttcaat aactaccagt tttttattgg tgaaaacatg     420
aatccagatg gtatggttgc ttcctggac taccgtgaag atggtgtgac tccattcatg     480
attttcttta aggatggctt agagatggag aaatgt                                516

```

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/07816

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ A61K45/00, A61K38/17, A61P3/10, A61P25/00, A61P13/12, A61P27/02, A61P3/06, A61P15/10, A61P17/00, A61P19/02, A61P19/10		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁷ A61K45/00, A61K38/17		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS (STN), MEDLINE (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KANETO H. et al., "Oxidative stress induces p21 expression in pancreatic islet cells. Possible implication in beta-cell dysfunction", Diabetologia, Vol.42, No.9, pages 1093 to 1097, (1999)	1-7,12-21, 24-33,36-39
Y		1-7,12-21, 24-33,36-39
Y		1-7,12-21, 24-33,36-39
	SJOEHOLM A., "Histaminergic regulation of pancreatic beta-cell replication and insulin secretion", Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol.214, No.1, pages 224 to 229, (1995)	
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 18 December, 2001 (18.12.01)		Date of mailing of the international search report 25 December, 2001 (25.12.01)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/07816

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 8-11,22-23,34-35
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The inventions as set forth in the above claims pertain to "methods for treatment of the human body by therapy" (Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT) .
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ A61K45/00, A61K38/17, A61P3/10, A61P25/00, A61P13/12, A61P27/02, A61P3/06, A61P15/10, A61P17/00, A61P19/02, A61P19/10

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ A61K45/00, A61K38/17

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CAPLUS (STN), MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	KANETO H. et al., "Oxidative stress induces p21 expression in pancreatic islet cells. Possible implication in beta-cell dysfunction", Diabetologia, Vol. 42, No. 9, pp. 1093-1097, 1999	1-7, 12-21, 24-33, 36-39
Y		1-7, 12-21, 24-33, 36-39
Y	SJOEHOLM A., "Histaminergic regulation of pancreatic beta-cell replication and insulin secretion", Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 214, No. 1, pp. 224-229, 1995	1-7, 12-21, 24-33, 36-39

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18. 12. 01

国際調査報告の発送日

25. 12. 01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高岡 裕美

4 P 9737

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 8-11, 22-23, 34-35 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
上記各請求の範囲に記載されているものは、「治療による人体の処置方法」に該当する。(特許協力条約に基づく規則39.1(iv))
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.